

ANNEE 1973-1974

THÈSE

de

DOCTORAT D'ÉTAT EN PHARMACIE

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA STRUCTURE DES PAROIS DE LEVURE DU GENRE RHODOTORULA

présentée et soutenue publiquement le 5 juillet 1974

par

Hassan MOULKI
PHARMACIEN

né le 20 avril 1947 à DAMAS (Syrie)

Titulaire des Certificats d'Etudes Supérieures de :

Biochimie Dynamique - Biochimie Générale - Immunologie
de Mycologie appliquée à la diagnose des Mycoses humaines et animales.

et des Certificats d'Etudes Spéciales de :

Attestation de Biochimie clinique - Attestation d'Immunologie générale et appliquée.

JURY :

M. le Professeur R. BENE, Doyen de la Faculté
M. le Professeur M. PIERFITTE
M. le Professeur MANGENOT
M. R. BONALY, Maître de Conférences Agrégé

Président

} *Juges*

ANNEE 1973-1974

THÈSE
de
DOCTORAT D'ÉTAT EN PHARMACIE

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA STRUCTURE
DES PAROIS DE LEVURE DU GENRE
RHODOTORULA

présentée et soutenue publiquement le 5 juillet 1974

par

Hassan MOULKI

PHARMACIEN

né le 20 avril 1947 à DAMAS (Syrie)

Titulaire des Certificats d'Etudes Supérieures de :

Biochimie Dynamique - Biochimie Générale - Immunologie
de Mycologie appliquée à la diagnose des Mycoses humaines et animales.

et des Certificats d'Etudes Spéciales de :

Attestation de Biochimie clinique - Attestation d'Immunologie générale et appliquée.

JURY :

M. le Professeur R. BENE, Doyen de la Faculté
M. le Professeur M. PIERFITTE
M. le Professeur MANGENOT
M. R. BONALY, Maître de Conférences Agrégé

Président

Juges



A MES PARENTS,

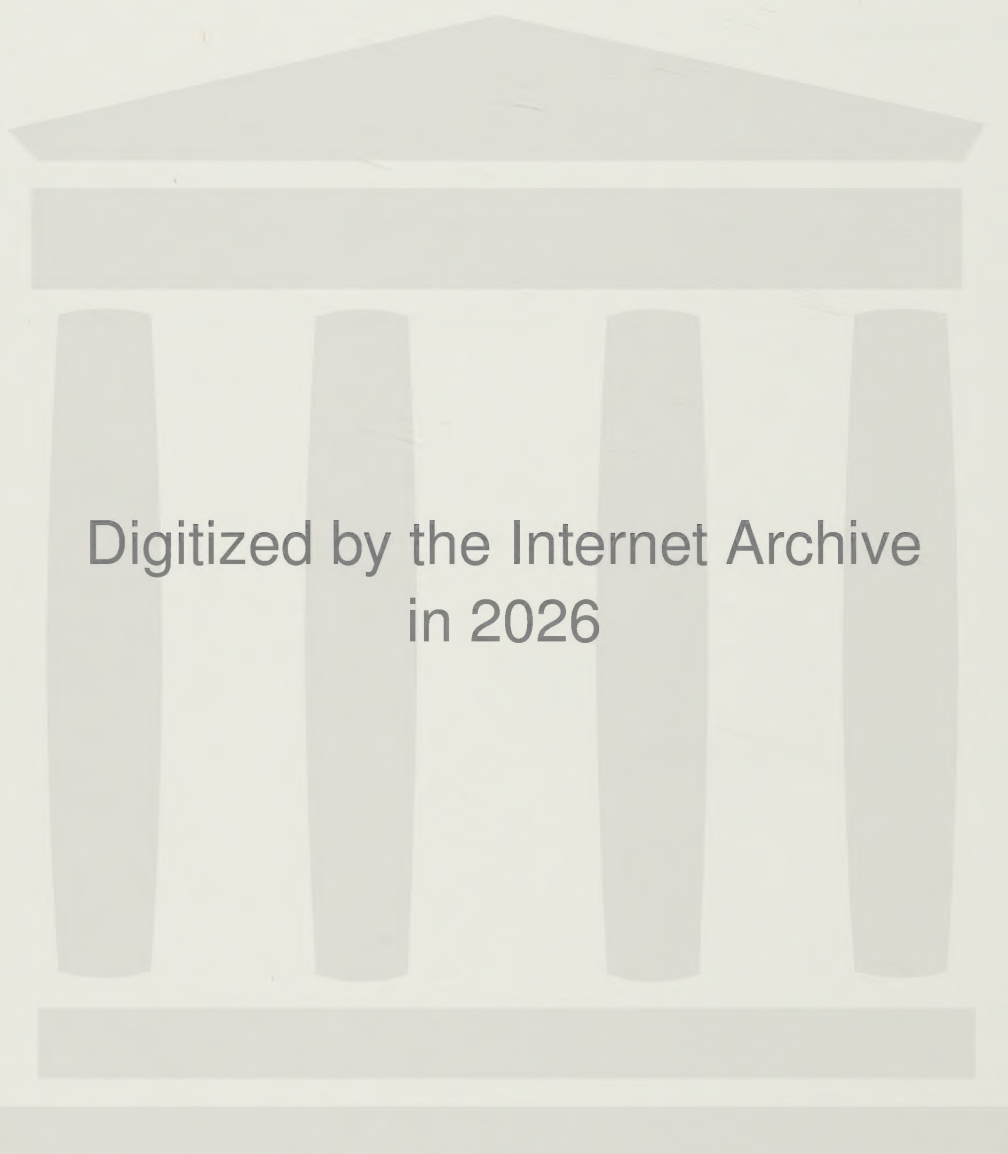
qu'ils trouvent ici un faible remerciement
pour leurs sacrifices et leur soutien
permanent.

En témoignage de mon affection.

A MA FEMME,

A MES FRERES ET SOEURS,

A MES BEAUX-PARENTS,



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547402_0035

AVANT-PROPOS

Avant de commencer l'exposé de nos recherches, il nous est particulièrement agréable de remercier ici tous ceux qui en ont permis la réalisation :

A notre Président de Thèse,

Monsieur le Professeur BENE, Doyen de la Faculté de Pharmacie de NANCY qui, malgré ses multiples responsabilités administratives nous a fait l'honneur d'accepter la présidence du Jury de notre Thèse. Qu'il trouve ici le témoignage de notre reconnaissance et de notre respect.

A Monsieur le Professeur PIERFITTE,

Professeur de chimie biologique à la Faculté de Pharmacie de NANCY, à qui j'exprime mes sincères remerciements pour l'accueil qu'il a bien voulu me réserver. Son aide et ses suggestions précieuses furent pour nous essentielles. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre profond respect et de notre reconnaissance.

A Monsieur le Professeur MANGENOT,

Professeur de Microbiologie à la Faculté des Sciences de NANCY I, qui nous a témoigné une grande bienveillance en acceptant de faire partie de notre Jury, qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre respect.

A Monsieur BONALY,

Maître de Conférences agrégé à la Faculté de Pharmacie de NANCY, qui nous a proposé le thème de cette recherche, nous a guidé et conseillé tout au long de sa réalisation dans les moments les plus délicats. Notre espoir est que ces résultats puissent correspondre à son attente et qu'il sache combien est fidèle l'amicale et respectueuse estime dans laquelle nous le tenons.

Que Monsieur le Professeur MONTREUIL, Professeur de chimie biologique à l'Université des Sciences et Techniques de LILLE, soit remercié pour son concours lors d'une étape importante de notre travail. Nous avons été très sensibles au privilège d'être accueillis dans son laboratoire ; sa gentillesse et son accueil chaleureux nous ont rendu nos deux séjours à LILLE, à la fois fructueux et agréables.

Je n'oublierai pas Monsieur FOURNET, dont les connaissances et l'habilité expérimentale, en matière de Chromatographie en phase gazeuse, m'ont permis de mener à bien une partie de ce travail, ainsi que toute l'équipe du Laboratoire de Chimie biologique de Monsieur le Professeur MONTREUIL.

Je remercie Monsieur JEANNOT du Laboratoire de Chimie minérale pour l'obligeance avec laquelle il a contribué aux études par rayons X.

J'exprime ma gratitude à Monsieur REISINGER pour la qualité des prises de vues de microscopie électronique.

Je ne saurais oublier Monsieur LEMATRE chargé de la Recherche au C.N.R.S., pour son aide et ses encouragements, qui furent pour nous très précieux.

Monsieur GLARDON nous a facilité notre travail par la préparation de nombreuses cultures de microorganismes ; qu'il trouve ici le témoignage de mes remerciements.

A B R E V I A T I O N S

Pour alléger le texte, les abréviations suivantes ont été utilisées :

S. cerevisiae	Saccharomyces cerevisiae
Rh	Rhodotorula
RMP	Rhodotorula rubra
3044	Rhodotorula glutinis (Fres.) Harrison CBS 3044
2200	Rhodotorula aurantiaca (Fres.) Harrison CBS 2200
D	milieu D
V	milieu V
Glc	glucose
Man	mannose
Gal	galactose
Me OH	méthanol
Glc NH ₂	glucosamine
Glc Nac	N-acétylglucosamine
Man Nac	N-acétylmannosamine
Gal Nac	N-acétylgalactosamine
DMSO	diméthylsulfoxyde
h	heures
V/cm	volt par centimètre
U V	ultra violet
M	molaire
nM	manomoles
Glu	acide glutanique
asp	acide aspartique
Hex N	hexosamine
Hex Nac	N-acétylhexosamine

UNIVERSITE DE NANCY I

Faculté des Sciences Pharmaceutiques
et Biologiques

ADMINISTRATION

DOYEN

Professeur R. BENE

VICE-DOYEN ADJOINT

Professeur M. PIERFITTE

PERSONNEL ENSEIGNANT

PROFESSEURS

M. BENE	Sciences Biologiques
M. BERNANOSE	Physique
M. MEUNIER	Pharmacie galénique
M. MARCHAL	Microbiologie
M. SOLEIL	Pharmacie chimique
Melle BESSON	Pharmacodynamie
M. MIRJOLET	Chimie analytique et Toxicologie
M. PIERFITTE	Chimie Biologique

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. MARTIN	Chimie minérale et minéralogie
Melle GIRARD	Hygiène
M. SIEST	Chimie Biologique
M. HAYON	Matière médicale et Botanique

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

M. SCHWARTZBROD	Microbiologie
M. BONALY	Chimie Biologique
M. LEMAY	Législation et déontologie pharmaceutique
M. LOPPINET	Chimie organique
M. VIGNERON	Sciences Biologiques appliquées à la Pharmacie

MAITRES - ASSISTANTS

Mme BALDO	Microbiologie
M. HOFFMAN	Pharmacie galénique
M. JACQUE	Pharmacodynamie
Mme HOFFMAN	Pharmacie galénique
Melle PANEK	Chimie Biologique

ASSISTANTS sur emplois de MAITRES - ASSISTANTS

Melle BARRET	Parasitologie
Melle MONCEAUX	Biochimie
M. LABRUDE	Pharmacotechnie chimie
Mme LEJAILLE	Chimie analytique
M. MIGNOT	Physique
M. MONAL	Pharmacie chimique
Melle HINZELIN	Biologie végétale et Pharmacognosie
M. NOTTER	Pharmacodynamie
Melle IMBS	Microbiologie

ASSISTANT sur emploi de CHEFS DE TRAVAUX

M. CONJAT	Chimie analytique quantitative
-----------	--------------------------------

DOYENS HONORAIRES

Monsieur le Recteur RICHARD
Monsieur le Doyen BERNANOSE

PROFESSEURS HONORAIRES

M. CORDEBARD
M. FRANQUET
M. STEIMETZ
Melle FRANCOIS

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

M. ANZIANI
Mme LASSEUR

SECRETAIRE PRINCIPAL

Monsieur MASSON

TABLE DES MATIERES

	Pages
<u>INTRODUCTION</u>	1
Composition générale des parois	4
Structure de la paroi cellulaire des levures	13
Objectifs du travail	15
 <u>MATERIELS ET METHODES</u>	 18
A - Matériel cellulaire	18
a) - Microorganismes	18
b) - Conservation des souches	18
c) - Culture des microorganismes	18
d) - Préparation des parois	20
 B - Techniques de dissolution et de fractionnement	 21
a) - Hydrolyse formique des parois	21
b) - Fractionnement des parois par l'éthylène diamine	21
c) - Traitement par l'acide chlorhydrique et l'hydroxyde de sodium	22
 C - Techniques analytiques	 22
a) - Analyse quantitative et qualitative de oses	22
1) Chromatographie qualitative sur papier	22
2) Chromatographie quantitative sur papier	24
3) Chromatographie quantitative en phase gazeuse	25
4) Dosage des oses neutres	26
b) - Analyse qualitative et quantitative des osamines	27
1) Analyse qualitative	27
a) Chromatographie sur papier Whatman 3 MM	27
b) Séparation électrophorétique des osamines	27
2) Analyse quantitative des osamines	28
c) - Méthylation des oses neutres selon la méthode de HAKAMORI, et suivant le mode opératoire de FOURNET	28

d) - Oxydation périodique	31
e) - Analyse des acides aminés	31
 D - <u>TECHNIQUES PHYSICO-CHIMIQUES</u>	32
a) - Filtration moléculaire sur gel	32
b) - Examen aux Rayons X	32
c) - Microscopie électronique	32
d) - Spectroscopie infra-rouge	32
e) - Ultracentrifugation	32
f) - Electrophorèse	33
 E - <u>TECHNIQUES ENZYMATIQUES</u>	33
a) - Traitement par l'hélicase	33
b) - Chitinase	34
c) - α D glucosidase et β -D glucosidase	34
d) - Complexe β glucannase	34
e) - Traitement par le lysozyme	34
f) - Traitement par la pronase	34
g) - Traitement par la cellulase	34
 <u>PREMIERE PARTIE</u>	
ETUDES MORPHOLOGIQUES, CHIMIQUES ET ENZYMATIQUES DES PAROIS DE LEVURES DU GENRE RHODOTORULA	36
 <u>CHAPITRE I :</u>	
Obtention des parois de levures : Rendement suivant le milieu de culture, aspect morphologique	37
 I- Influence du milieu de culture sur la croissance des levures et le rendement en parois	38
 <u>CHAPITRE II :</u>	
Composition chimique des parois des levures selon le milieu de culture	48
 I - Composition chimique des parois	50

a) - Teneur en azote total	50
b) - Teneur en phosphore	52
c) - Teneur en hexosamine	52
Traitement solubilisant par l'acide formique	56

II - Nature des hexosamines	61
-----------------------------	----

CHAPITRE III :

Fractionnement des parois	66
---------------------------	----

I - Traitement des parois par l'éthylène diamine	66
--	----

A) - Taux des fractions A, B et C dans les parois de levure <u>Rhodotorula</u>	70
---	----

B) - Composition chimique des fractions A, B et C	71
---	----

C) - Etude morphologique des fractions C	74
--	----

CHAPITRE IV :

Etude de la chitine	84
---------------------	----

I - Influence du milieu de culture sur la teneur en hexosamine des parois des levures du genre <u>Rhodotorula</u>	87
--	----

II - Préparation de la chitine témoin	88
---------------------------------------	----

III - Extraction directe de la chitine par l'acide chlorhydrique à 30 %	88
---	----

IV - Isolement de la chitine par traitement modéré acide et alcalin des parois	94
---	----

V - Isolement de la chitine à partir des fractions C	98
--	----

VI - Teneur globale en chitine dans les parois d'après les produits "Pt", "Pn" et "Ct"	102
---	-----

CHAPITRE V :

Utilisation d'enzymes dans l'étude structurale des parois	106
---	-----

I - Action de l'hélicase sur les parois des levures <u>Rhodotorula</u>	108
---	-----

II - Traitement des parois et des cellules entières par divers systèmes enzymatiques	110
---	-----

a) - Traitement des parois par la cellulase de <i>Trichoderma viridie</i>	110
b) - Action des enzymes lytiques : pronase, hélicase "complexe glucannase"	111

DEUXIEME PARTIE

ETUDE DE LA STRUCTURE D'UNE GLYCOPROTEINE ISOLEE DES PAROIS DE RHODOTORULA RUBRA	116
--	-----

Filtration sur gel de la fraction A	117
-------------------------------------	-----

1) Etude de la sous-fraction Ab'	120
----------------------------------	-----

2) Etude de la sous-fraction Aa'	122
----------------------------------	-----

- Etude de Aa'/1	124
------------------	-----

a) - Critère d'homogénéité	124
----------------------------	-----

b) - Composition qualitative du produit Aa'/1	127
---	-----

c) - Estimation quantitative des composants du produit Aa'/1	128
--	-----

d) - Méthylation des oses neutres du produit Aa'/1	138
--	-----

e) - Oxydation périodique du produit Aa'/1	147
--	-----

f) - Acétolyse du produit Aa'/1	148
---------------------------------	-----

g) - Action des systèmes enzymatiques sur le produit Aa'/1	151
--	-----

1) Hydrolyse pronasique	151
-------------------------	-----

2) Traitement du produit Aa'/1 par l' α et la β glucosidase	154
--	-----

- Etude de la sous-fraction Aa'/2 et Aa'/3	159
--	-----

<u>CONCLUSION</u>	163
-------------------	-----

I N T R O D U C T I O N

Toute cellule qu'elle soit animale, végétale ou microbienne, est entourée d'une enveloppe qui isole le suc cellulaire. Les microorganismes, bactéries (à l'exception des mycoplasmes) champignons ou levures sont entourés d'une double enveloppe : la membrane plasmique interne et la paroi cellulaire externe.

Le protoplasme d'une cellule vivante est le siège d'une pression osmotique variable, fonction des concentrations des substances solubilisées, et due au rôle sélectif joué par la membrane plasmique qui, grâce à une combinaison de transporteurs spécifiques, règle les échanges avec le milieu extérieur. Cette membrane, en raison de sa fragilité, ne peut résister à la forte pression interne et c'est à la paroi qu'est attribué ce rôle de protection.

Lorsque la cellule est privée de sa paroi, mais maintenue dans un milieu de pression osmique convenable, elle se transforme en éléments parfaitement sphériques appelés protoplastes. Cependant si la pression osmotique du milieu extérieur est diminuée, les protoplastes éclatent ; la membrane plasmique apparaît alors comme un sac vide.

La paroi constitue donc bien une structure de protection de la vie cellulaire. C'est un véritable squelet-

te externe, une carapace qui maintient la forme de la cellule en dépit de la forte pression osmotique intra-cellulaire.

Il est actuellement établi que l'activité de certains antibiotiques s'exerce au niveau des parois bactériennes en inhibant leur biosynthèse (1) (2). L'étude approfondie de ce phénomène a permis une meilleure connaissance de la structure chimique des parois.

La paroi est le siège d'un échange perpétuel entre la cellule vivante et le milieu environnant ; les substances nutritives d'une part, les déchets métaboliques d'autre part transitent à travers elle. La paroi n'est cependant pas un simple filtre à travers lequel les substances ne font que passer ; chez les levures, elle constitue une structure plus complexe mettant en jeu des phénomènes biologiques grâce à des systèmes enzymatiques qui s'y trouvent localisés (3).

Les parois peuvent aussi jouer un rôle important dans la pathogénicité de certaines espèces de champignons ou de levures. C'est ainsi que dans les candidoses, on assiste à une transformation de Candida albicans de la forme levure à la forme mycélienne, avec une modification de la composition chimique et de la structure des parois (4). D'autre part des propriétés immunologiques, spécifiques ou non, résident dans des portions bien déterminées des différents polysaccharides des parois.

Enfin, l'étude de la composition chimique globale des parois des champignons et levures est utilisée par certains auteurs pour une classification taxonomique de ces microorganismes (Tableau 1).

Classification taxonomique de champignons et de levures
selon la composition chimique de la paroi d'après
BARTNICKI-GARCIA (5)

Tableau 1

Composition chimique de la paroi	Groupe taxonomique
I. Cellulose-glycogène	Acrasiales
II. Cellulose-glucanne	Oomycètes
III. Cellulose-chitine	Hyphochytridiomycètes
IV. Chitosane-chitine	Zygomycètes
V. Chitine-glucanne	Chytridiomycètes
	Ascomycètes
	Deuteromycètes
VI. Mannane-glucanne	Saccharomycetaceae
	Cryptococcaceae
VII. Mannane-chitine	Sporobolomycetaceae
	Rhodotorulaceae
VIII. Polygalactosamine- Galactanne	Trichomycetes

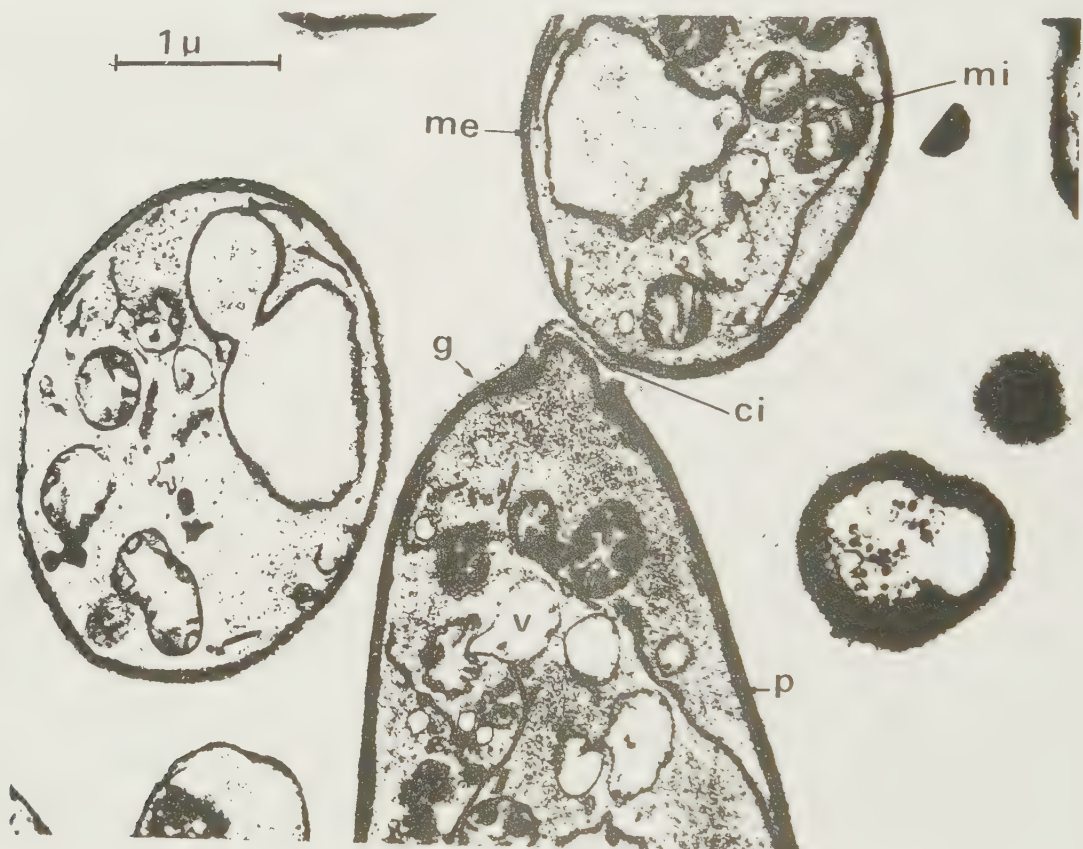
Il ressort de ce tableau que la paroi des champignons et des levures est constituée de divers composés polysaccharidiques tels que cellulose, chitine, mannane et glucanne, qui diffèrent suivant les genres, les familles voire les espèces.

L'étude des parois bactériennes a fait l'objet de recherches depuis déjà de très nombreuses années et les ouvrages traitant de la structure et de la biosynthèse de ces éléments cellulaires sont nombreux.

Les parois des levures n'ont attiré que plus

tardivement la curiosité des chercheurs, pourtant ces microorganismes présentent un intérêt non négligeable en raison de leur utilisation industrielle et du caractère pathogène de certains espèces.

La photographie ci-après d'une levure Rhodotorula révèle les principaux caractères morphologiques de ces microorganismes.



g: gaine
p: paroi
v: vacuole

ci: cicatrice de bourgeonnement
mi: mitochondrie
me: membrane plasmique

Composition générale des parois

Les premières études sur les parois de levures datent des travaux de SALKOWSKI qui, en 1894, prépara des polysaccharides insolubles à partir de levures entières ;

mais toutes les expérimentations réalisées en soumettant des cellules entières à des traitements chimiques manquaient de précision. En effet, bien que par ces techniques, il fut possible de déterminer quelques constituants pariétaux, beaucoup d'autres échappaient à l'investigation par suite de leur destruction au cours des traitements chimiques. De plus, une éventuelle contamination par des éléments cytoplasmiques pouvait toujours exister.

En conséquence, pour réussir une étude valable, il apparaissait nécessaire d'obtenir au préalable un bon isolement de la paroi. Actuellement il n'existe pas de procédé standard pour la préparation des parois de levures ; l'obtention d'éléments propres et dépourvus de contaminants cytoplasmiques et intra-cellulaires reste un problème très délicat et l'estimation de la pureté d'une préparation est très difficile.

Un des moyens les plus couramment utilisé de nos jours consiste à broyer les cellules à l'aide de billes de verre dans des homogénéiseurs cellulaires. Des centrifugations et des lavages répétés permettent ensuite d'isoler les parois (6), qui se présentent alors soit sous forme de lambeaux, soit sous forme d'enveloppes vides. L'examen au microscope à contraste de phase permet d'évaluer sommairement la propreté des préparations ; elle est confirmée par l'étude au microscope électronique de coupes de parois (7).

Les parois de levures constituent un ensemble macromoléculaire d'une grande complexité, aussi, les méthodes d'études sont-elles très variées (8). Le caractère polymérique tridimensionnel des parois de levure, lié au rôle physiologique de protection du microorganisme, rend celles-ci insolubles à la fois dans l'eau et la plupart des solvants organiques.

Par conséquent, l'étude de leur composition

chimique nécessite, au préalable, un traitement à même de cliver certaines des liaisons et de détacher des fragments solubles.

Les traitements de clivage sont variés, de nature alcaline ou acide. Ainsi, l'estimation de la teneur globale des protéines par les méthodes de Folin -LOWRY ou du Biuret,, implique-t-elle d'abord l'action des alcalis à froid (9) (10) (11) (12), des alcalis à l'ébullition (13) (14) (15) ou l'acide trichloro-acétique à 5 % (16).

L'emploi d'éthylène diamine, d'ammoniaque dilué, liqueur de Fehling a permis de préparer des glucannes, des mannanes et des complexes de nature glycoprotéique (17).

Plus récemment, il s'est développé des méthodes nouvelles faisant appel à des systèmes enzymatiques d'hydrolyse. Leur impact est spécifique de certains types de liaisons ; et leur emploi est précieux, car les enzymes opérant dans des conditions douces proches de la température ambiante, à des pH non extrêmes. Ainsi, le risque de transformation artificielle des constituants est-il beaucoup plus limité qu'avec les méthodes chimiques énergiques seules utilisées au début des études.

Malgré leur grand intérêt, les clivages enzymatiques ont des limites en raison même de la complexité de la structure des parois dans lesquelles les polymères différents s'entrecroisent et se relient.

Un seul type de clivage ne permettra donc pas une désorganisation complète et une décomposition suffisante en monomères ou fragments de taille limitée.

De plus, même la détermination de tous les monomères et de leur type de liaison ne conduira "ipsofacto" à la connaissance complète de la paroi, pas plus que le fait

de savoir le nombre et la qualité des poutres et chevrons ne renseignera complètement sur la structure d'une charpente.

Ainsi, devant une telle complexité, il doit être fait appel à toutes les techniques de la chimie et de la physique.

Les parois de levure renferment de 80 à 90 % de polysaccharides, le reste étant formé en proportions variées de protéines, de lipides et d'éléments minéraux (5). La présence d'acides nucléiques dans les parois a été signalée (19) (20) mais n'est pas encore admise par tous les auteurs.

Les différents glucides principaux constituants des parois, sont reliés entre eux et forment des polymères, ceux-ci peuvent être homogènes c'est-à-dire uniquement à base de mannose (mannane), de glucose (glucanne), de β -N-acétylglucosamine (chitine), ou bien hétérogènes, c'est-à-dire de types phosphomannanes, galactomannanes ou glucomannanes.

Les premières recherches ont permis de constater que les parois de Saccharomyces cerevisiae contenaient un polysaccharide insoluble en solution alcaline et qui, par hydrolyse acide ne libérait que du glucose. Ce composé fut donc initialement appelé "cellulose de levure".

Les glucannes ont depuis été décrits dans toutes les parois de levures. La structure de ces polymères de glucose a été surtout bien étudiée chez Saccharomyces cerevisiae.

En effet, dès 1934, ZECHMEISTER et TOTH (21) démontraient par méthylation des oses, la présence de liaisons $1 \longrightarrow 3$; ces résultats devaient se trouver con-

firmés par le fait que l'oxydation périodique restait négative. Des hydrolyses ménagées devaient permettre également d'isoler du laminaribiose, disaccharide formé de glucose relié par des liaisons $\beta 1 \longrightarrow 3$. Plus tard, un autre disaccharide "le gentiobiose" put être déterminé, ce qui indiquait également la présence de liaisons $\beta 1 \longrightarrow 6$. Ces investigations suggèraient la présence d'un polysaccharide à base de glucose en liaison $1 \longrightarrow 6$ et $1 \longrightarrow 3$ (22) (23). La structure de ce polymère restait pourtant inconnue. En se basant sur leurs résultats de méthylation et d'oxydation périodique, MISAKI et coll. (24) tentèrent de montrer que le glucanne des parois de Saccharomyces cerevisiae avait une structure ramifiée dont la chaîne de base est essentiellement formée de maillons β glucosyle en liaison $1 \longrightarrow 3$ comme indiqué dans la Figure 1.

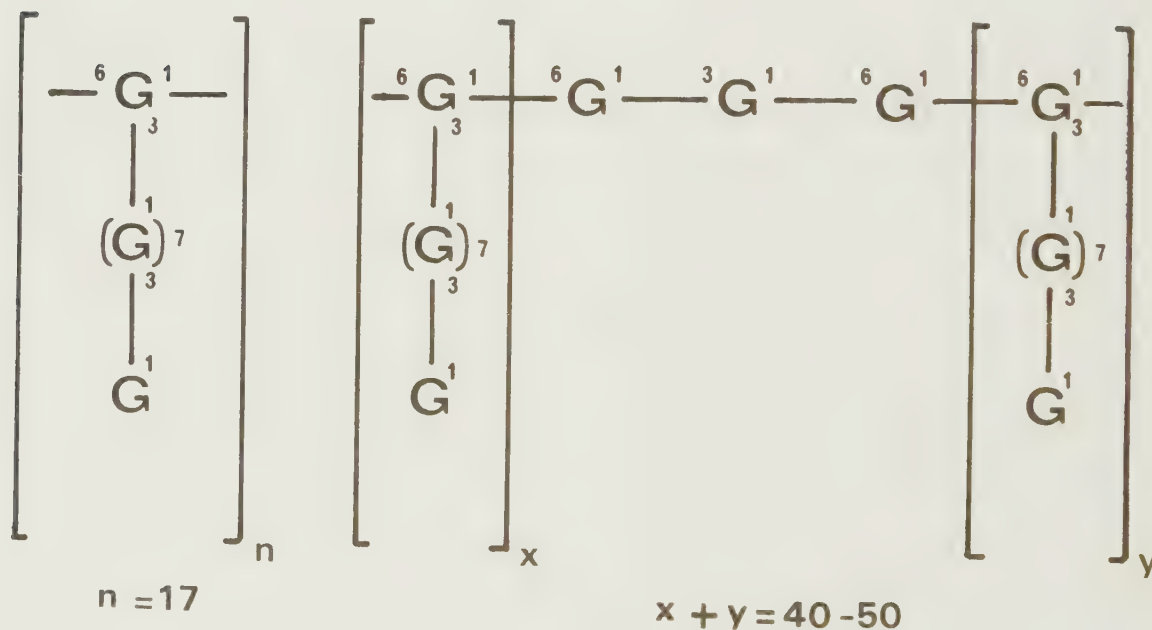


Fig. 1 : Schéma de la structure de glucanne de paroi de Saccharomyces cerevisiae d'après MISAKI et coll. (24)

Un des résultats qui a conduit ces auteurs à proposer cette structure est que l'action de l'acide périodique sur ce glucanne est très faible ; il ne peut donc pas exister de longues chaînes de maillons glucose liés en

$\beta 1 \longrightarrow 6$ sans substitution sur l'hydroxyle en position 3 des molécules.

Cette structure ne devait pas satisfaire tous les auteurs et récemment BACON et coll. (25), MANNERS et coll. (26) en traitant les parois de Saccharomyces cerevisiae par la soude et l'acide acétique ont démontré la présence d'un mélange de deux glucannes, l'un formé en majeure partie de liaisons $\beta 1 \longrightarrow 6$, et ayant un degré de polymérisation de 130 ± 10 unités osidiques, l'autre formé principalement de liaisons $\beta 1 \longrightarrow 3$ et ayant un degré de polymérisation de 1400 unités environ.

Les glucannes isolés d'autres espèces ont été moins étudiés ; dans certaines levures des genres Schizosaccharomyces, Cryptococcus, Polyporus, les recherches ont permis de mettre en évidence des glucannes extractibles à 75° C par une solution d'hydroxyde de sodium (27) et ayant des liaisons $\alpha 1 \longrightarrow 3$.

Les glucannes ne constituent pas à eux seuls la partie polysaccharidique des parois. On trouve souvent associé au moins un second polymère qui est le plus souvent un mannane. Les mannanes ont été isolés de la levure de boulangerie dès 1894 (28). Les travaux de HAWORTH et coll. (29) (30) ont révélé qu'il s'agissait de polymère du mannose très ramifiés, dont la chaîne de base est formée d'unités mannosyles en liaisons $1 \longrightarrow 2$ et portant des ramifications en position 6 (Fig. 2 a). Des études ultérieures (31) ont montré qu'il s'agirait plutôt de polymères ayant une chaîne de base avec des unités en $1 \longrightarrow 6$ et des ramifications en position 2 (Fig. 2 b).

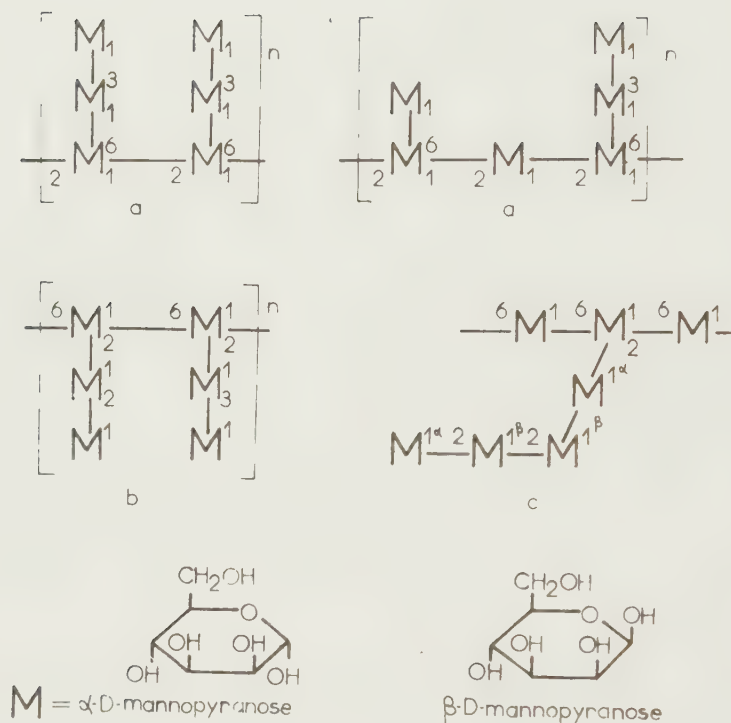


Fig. 2 : Schéma de la structure des mannanes

a et b : mannane formé uniquement de maillons α D mannopyranose.

c : Mannane formé de maillons α D ou β D mannopyranose.

Cette même structure a été retrouvée chez deux souches de Candida chez lesquelles STRYCKOVA et coll. (32) ont démontré la présence de deux types de liaisons α 1 $\longrightarrow$ 2 et α 1 $\longrightarrow$ 6 entre des résidus D mannopyranose.

La structure des mannanes peut être plus complexe par suite de la présence simultanée dans le même polymère des anomères α et β du mannose ; c'est ainsi que dans les polysaccharides des parois de Pichia pastoris (33) les ramifications fixées sur les chaînes de base sont constituées de maillons α et β mannopyranose (Fig. 2 c).

Les deux types de polysaccharides, glucanne et mannane , sont généralement en proportions différentes, mais dans certains cas les parois, telles celles de Saccharomyces cereviasiae peuvent en contenir un pourcentage identique (34). Nous noterons que dans des travaux anciens, les mannanes n'avaient pas été caractérisés dans les parois de levures des genres Saccharomyces, Nadsonia, et Rhodotorula (35).

A côté des polysaccharides neutres, les parois renferment en quantité généralement faible un polymère à base de glucosamine : la chitine.

La chitine, polymère de β -N-acétylglucosamine en liaison 1 $\longrightarrow$ 4 représente une partie du résidu insoluble après extraction alcaline des mannanes . La chitine peut être caractérisée par son spectre de diffraction des rayons X. Elle est retrouvée chez presque toutes les levures sauf chez certaines souches de Schizosaccharomyces (36).

Protéines

Dans les parois, la teneur en protéines varie suivant les espèces et suivant le milieu nutritif dans lequel se développent les levures.

Le pourcentage de protéines dans les parois de levures varie en général de 5 à 7 % ; cependant les parois de Saccharomyces guttulata peuvent renfermer jusqu'à 40 % de protéines (37).

On retrouve généralement la gamme usuelle des aminoacides classiques, avec prédominance de certains acides aminés dans certains cas (sérine, thréonine, acide aspartique et acide glutamique (18)).

La nature des liaisons entre protéines et glucides a été étudiée depuis les travaux de FALCON (38), KESLLER (39) qui ont réussi à isoler des parois des complexes de nature glycoprotéinique. Mais ce sont surtout les travaux de KORN et NORTHCOTE (40) de SENTADREU et NORTHCOTE (41) (42) qui ont permis de mettre en évidence dans les complexes manno-protéiques une liaison de type O-glycosidique et en plus la possibilité d'une liaison de type aspartyl β -D N-acétylglucosamine (Figure 3).

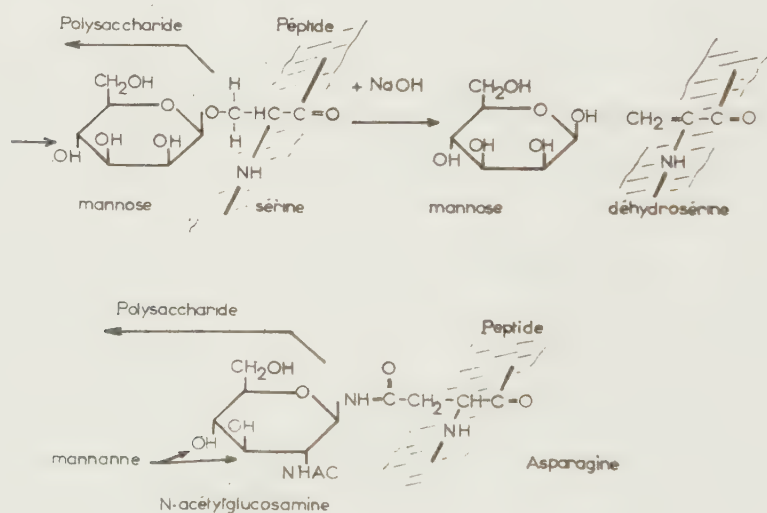


Fig. 3 : Types de liaison entre la copule protéique et la copule glucidique.

A - Liaison β O-glycosidique labile à l'alcalin

B - Liaison β N-asparaginyl N-acétylglucosaminide.

Lipides

En plus des polymères et composés divers déjà cités, on rencontre dans les parois des lipides, leurs concentrations varient en fonction du milieu nutritif et de l'âge des cellules, ou encore selon la morphologie du microorganisme (43). Certains genres de levures tels que Rhodotorula, Torulopsis, Candida, peuvent excréter des quantités relativement importantes de lipides dans le milieu de culture. Toutefois, jusqu'à ce jour, aucun composé macromoléculaire contenant des lipides n'a pu être isolé et caractérisé dans les parois.

Structure de la paroi cellulaire des levures

Lorsque l'on désire déterminer l'enchaînement, la localisation et la disposition des différentes macromolécules, les unes par rapport aux autres dans la paroi, les méthodes d'investigations par voie enzymatique offrent des possibilités intéressantes en raison de la douceur et de la spécificité de leurs actions.

A l'aide d'enzymes telles que glucannase, mannanase (44) (45) et d'enzymes protéolytiques un certain nombre de chercheurs ont réussi à cliver, par étapes successives, une grande partie de la paroi des levures (46) (47) en éléments solubles.

Le traitement des cellules entières de Saccharomyces cerevisiae par la phosphomannanase libère les phosphomannanes et des enzymes pariétales localisées dans la couche externe des parois. Cette première attaque, éliminant une couche de composés, rend l'action de la glucannase positive. La glucannase est en effet inactive sur les parois de cellules entières de Saccharomyces cerevisiae, mais sur les parois isolées, cette enzyme est directement active, car l'attaque peut-être opérée par la face interne.

Toutefois, il ne faut pas généraliser le fait

que la couche la plus externe des parois est formée de phosphomannanes et cela même chez toutes les levures du genre Saccharomyces.

CAWLEY et BALLOU (48) en utilisant des techniques immunologiques ont montré que suivant les souches de Saccharomyces les composés les plus externes se trouvaient soit sous forme de phosphomannanes soit sous forme de mannanes neutres. Dans les couches profondes de la paroi, les complexes macromoléculaires protéines-mannanes et protéines-glucannes pourraient être reliés par des ponts disulfures (47) reliant deux restes cystéinyles de deux chaînes protéiques. Un traitement préalable des levures par des agents réducteurs du type mercapto-éthanol, coupe ces ponts disulfures, dénature la copule protéique et facilite l'obtention des sphéropastes (49).

Enfin si les mannanes sont localisés dans la couche externe des parois de Saccharomyces, chez les levures du genre Candida, ce sont au contraire les glucannes qui sont localisées à la périphérie, ce qui explique l'action directement positive des β 1 $\longrightarrow$ 3 glucannases.

En ce qui concerne la chitine, il est actuellement admis qu'une partie importante est localisée au niveau des cicatrices de bourgeonnement, le reste semble former une matrice solide sur laquelle se fixent les glucannes. La chitine peut donc ainsi jouer un rôle stabilisateur des glucannes.

L'association des différents éléments forme une structure originale d'aspect fibrillaire qui est visible parfois au microscope électronique.

L'épaisseur de la paroi varie d'une souche à l'autre et pour une même souche suivant les milieux de culture. Les renseignements sur l'architecture de la paroi

de levure sont donc déjà nombreux mais assez fragmentaires et différent suivant les genres. Toutefois, les nombreux travaux réalisés sur les parois de Saccharomyces cerevisiae permettent de proposer un schéma vraisemblable de l'architecture de cette paroi, mais rien ne permet d'affirmer que cette structure soit identique dans d'autres parois. L'état actuel des connaissances justifie la nécessité d'étudier et d'aborder l'étude de cet élément cellulaire cas par cas en précisant les conditions de culture des levures.

Depuis qu'il est possible d'obtenir des préparations de parois parfaitement débarrassées de contaminants cellulaires, les études chimiques et morphologiques de ces éléments cellulaires des levures se sont multipliées, surtout ces dernières années. Malgré tous les résultats déjà recueillis, la disposition exacte des éléments glucidiques et protidiques, voire leur nature, n'est pas encore complètement élucidée. Il est difficile, impossible même, de tirer une conclusion générale ; de plus on ne sait toujours pas si la rigidité et la solidité de la paroi sont dues à une ou plusieurs macromolécules.

Les levures Saccharomyces et Candida ont fait l'objet d'études nombreuses et variées en ce qui concerne leur paroi ; ce n'est pas le cas des levures Rhodotorula qui n'ont suscité jusqu'à ce jour qu'un nombre limité de travaux (50) (51) (52) (53). C'est l'une des raisons pour lesquelles nous avons entrepris ce travail sur ces levures qui, par ailleurs, ont déjà fait l'objet de recherches dans d'autres domaines au laboratoire.

Objectifs du travail

Les levures du genre Rhodotorula sont des micro-organismes aérobies stricts et ne présentent pas de dimorphisme ; elles se rencontrent fréquemment en tant que saprophytes des plantes et des animaux. Rh. rubra a été signalée comme germe pathogène dans quelques cas (54).

Dans une première partie de notre travail, nous avons abordé une étude morphologique et chimique des parois de trois espèces de Rhodotorula :

Quelques observations préliminaires sur la morphologie, réalisées par microscopie électronique nous ont révélé certaines différences suivant les conditions de culture des cellules et nous ont conduit à réaliser une étude de la composition chimique globale.

Les résultats obtenus concernant les teneurs en azote, en phosphore, et en hexosamines, et le traitement par l'acide formique permettent d'accéder à la détermination des monomères.

Il est bien évident que ces méthodes globales ne peuvent conduire à une connaissance suffisante des parois, c'est pourquoi ce premier examen sera suivi d'une investigation plus détaillée qui nécessite un fractionnement des parois.

Le fractionnement est réalisé suivant la méthode de KORN et Coll. (40) au moyen d'éthylène diamine. Différentes fractions sont ainsi séparées, et dans l'une d'elles nous trouvons la chitine. Ce polymère retiendra notre attention et nous comparerons la teneur suivant les souches et les milieux nutritifs. Nous terminons cette première partie du travail en donnant des résultats obtenus après traitement des parois par des systèmes enzymatiques.

Dans la seconde partie de notre travail, nous étudions la structure d'une glycoprotéine isolée des parois de Rh. Rubra. Nous décrivons successivement son isolement, son analyse chimique, et nous essaierons de proposer une structure.

L'ensemble de nos travaux amène à conclure que les parois des Rhodotorula présentent une structure bien plus complexe que les parois de Saccharomyces ou Candida les plus couramment étudiées. Au cours de ce travail, d'autres problèmes soulevés peuvent conduire à de nouveaux thèmes de recherches.

M A T E R I E L S E T M E T H O D E S

Nous allons décrire dans ce chapitre le matériel cellulaire et les conditions de culture utilisées au cours de toute notre expérimentation.

Les traitements appliqués aux levures et aux parois ainsi que les différentes techniques analytiques seront décrits. Les détails opératoires correspondant à des expérimentations particulières seront données à leur place dans le texte.

A - MATERIEL CELLULAIRE

a) Microorganismes

Nous avons utilisé trois souches de levures :

- *Rhodotorula rubra* (JORG.) Harrisson, RMP ; isolée au laboratoire par J. VILLOUTREIX (55).
- *Rhodotorula glutinis* (Fres.) Harrisson, CBS 3044
- *Rhodotorula aurantiaca* (Fres.) Harrisson, CBS 2200

b) Conservation des souches

Les levures sont conservées par des repiquages trimestriels sur un milieu à base de moût de bière et gélosé.

c) Culture des microorganismes

Les levures ont été cultivées dans deux milieux liquides différents, D et V, dont la composition respective est la suivante :

Milieu D, préconisé par DEINEMA (56)

Glucose	40 g
Extrait de levure (Difco)	1,5 g

H_2KPO_4	1 g
$\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,20 g
H_2O distillée	1.000 ml

A cette formule nous ajoutons deux gouttes d'antimousse (suspension de silicone Rhodorsil-Antimousse 426 Rhône-Poulenc)

Milieu V. préconisé par J. VILLOUTREIX (55)

Saccharose	20 g
KH_2PO_4	2 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3 g
NaCl	0,1 g
$\text{Mg SO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	0,25 g
CaCl_2 , anhydre	0,2 g
$\text{MgCl}_2, 4\text{H}_2\text{O}$	0,001 g
$\text{Zn SO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	0,001 g
H_3BO_3	0,001 g
FeCl_3	0,0005 g
$\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$	0,0001 g
KI	0,0001 g
Eau distillée	1,000 ml
Antimousse	II gouttes

Les facteurs de croissance sont introduits dans ce milieu V sous forme de jus de levure préparé selon le procédé de CONWAY (57).

Les cellules sont repiquées dans des fioles d'Erlenmeyer de 100 ml contenant 20 ml de milieu stérilisé à 120°C pendant 20 minutes. Ces petites cultures sont agitées par un barreau magnétique pendant 48 heures à 30°C et servent d'inoculum pour les cultures en ballon de 3 litres renfermant 2 litres de l'un ou l'autre des deux milieux.

Après 48 heures de préculture en ballon, on ensemence les 14 litres de milieu contenus dans un incubateur de type Biosyntha dont la capacité totale est de 20 litres.

Ces cultures en ballon et en incubateur sont aérées par barbotage d'air comprimé filtré dont le débit est réglé à 2 litres par minute. Après 4 jours de croissance à température ambiante, les levures sont récoltées par centrifugation à +4°C.

d) Préparation des parois

Les cellules sont remises en suspension aqueuse (un poids équivalent à 3 g de levure sèche dans 10 ml d'eau) puis broyées dans des fioles de 70 ml à l'aide de 50 g de billes de verre dans l'homogénéiseur MSK (Braun-Melsungen) durant 3 minutes, sous un courant de neige carbonique maintenant la température de l'ensemble au voisinage de 0°C.

Le broyat est ensuite épuisé à plusieurs reprises par l'acétone jusqu'à décoloration, ce qui élimine la plus grande partie des lipides et des pigments caroténoïdes, et facilite grandement les opérations ultérieures de lavage et de centrifugation.

Le broyat ainsi traité est remis en suspension

dans l'eau, lavé cinq fois avec de l'eau distillée et soumis à un second broyage dans les mêmes conditions que ci-dessus.

Afin d'éliminer les impuretés cytoplasmiques de nature protéique, les parois sont remises en suspension dans un tampon phosphate disodique 0,01 M à pH = 8, puis incubées en présence de trypsine (concentration 0,2 %) pendant 3 heures à 37°C avec une agitation intermittente. Elles sont ensuite lavées une vingtaine de fois et à chaque fois remises en suspension dans l'eau à l'aide d'un mixer. Les parois ainsi lavées doivent paraître homogènes au microscope à contraste de phase. Leur pureté a été confirmée dans certains cas par microscopie électronique sur des coupes de parois.

Les parois cellulaires étant des éléments particuliers difficiles à mettre et à maintenir en suspension, toute étude demande donc leur mise en solution afin de pouvoir appliquer les diverses techniques analytiques sur des prises d'essais aussi homogènes que possible.

B - TECHNIQUES DE DISSOLUTION ET DE FRACTIONNEMENT

a) Hydrolyse formique des parois

Les parois sont traitées par de l'acide formique à 90 % en tube scellé pendant 15 heures à 110°C et à raison de 20 mg de parois pour 40 ml de solution d'acide formique.

L'acide formique est ensuite éliminé à l'évaporateur rotatif en ne dépassant pas 40°C. Le résidu est repris deux fois par de l'eau distillée puis lyophilisé.

b) Fractionnement des parois par l'éthylène diamine

Le traitement par l'éthylène diamine a été préco-

nisé par KORN ET NORTHCOTE (40) pour isoler différentes fractions des parois de levures du genre Saccharomyces.

Nous avons appliqué ce traitement pour fractionner les différentes parois de levures du genre Rhodotorula selon un protocole indiqué plus loin.

c) Traitement par l'acide chlorhydrique et l'hydroxyde de sodium

Dans le but d'isoler la chitine, nous avons appliqué dans ses grandes lignes le mode opératoire préconisé par HOUWINK et KREGER (58) et par KORN et NORTHCOTE (40).

L'échantillon, soit 1 g de parois lyophilisées, est d'abord traité par 50 ml d'acide chlorhydrique à 3 % pendant 1 heure au bain-marie bouillant. Le résidu recueilli par centrifugation est lavé jusqu'à neutralité. Il est ensuite traité par 50 ml d'hydroxyde de sodium à 3 % pendant 15 minutes au bain-marie bouillant. Le résidu est enfin lavé avec l'eau distillée jusqu'à neutralité puis lyophilisé et conservé sous P_2O_5 .

C - TECHNIQUES ANALYTIQUES

a) Analyse quantitative et qualitative des oses

1) Chromatographie qualitative sur papier

La chromatographie qualitative s'effectue sur papier Whatman 3 MM et Whatman 1. Nous utilisons la technique de chromatographie descendante en opérant à la température du laboratoire. La durée de la chromatographie varie de 15 à 18h. L'identification des composés est réalisée par comparaison de leur comportement chromatographique avec celui de substances de référence.

Les systèmes solvants utilisés sont les suivants :

Solvant A : n-butanol - pyridine - eau (6 - 4 - 4, v/v/v).
Ce système solvant fournit en 18 heures une résolution satisfaisante des oses suivants : glucose, galactose, mannose, fucose ainsi que glucosamine.

Solvant B : Acétate d'éthyle - pyridine - eau (2 - 1 - 2, v/v/v). Ce système solvant de JERMYN et ISERWOOD (59) donne en 15 heures une excellente séparation du glucose et du mannose.

Solvant C : n-butanol - acide acétique - eau (4 - 1 - 5 - v/v/v). Ce système solvant de PARTRIDGE (60) fournit une résolution satisfaisante des oligosaccharides. Exceptionnellement la chromatographie peut être prolongée pendant 3 jours pour ce système de solvants.

Les différents révélateurs des chromatogrammes utilisés sont les suivants :

a - Réactif au nitrate d'argent alcalin (61)

Le chromatogramme bien séché est trempé dans une solution acétonique de nitrate d'argent (1 ml de solution aqueuse saturée de Ag NO_3 est étendue à 100 ml par de l'acétone. Un précipité se forme, il est redissout en ajoutant goutte à goutte de l'eau distillée et en quantité juste suffisante pour faire disparaître le précipité formé). Le papier est ensuite bien séché à température du laboratoire pendant 10 minutes sous ventilation énergique. On pulvérise alors une solution alcoolique d'hydroxyde de sodium 0,5 N.

Le papier est abandonné environ 20 minutes à la température du laboratoire, c'est-à-dire jusqu'à ce que les taches apparaissent bien contrastées, puis la réaction est arrêtée en trempant successivement le papier dans une solution de thiosulfate de sodium à 10 %, puis dans l'eau distillée.

b - Réactif au citrate d'aniline de WHITE et coll. (62)

Le réactif est un mélange à volume égal et extemporané de deux solutions :

- Solution d'aniline dans l'éthanol absolu à 2 % v/v;
- Solution aqueuse d'acide citrique 0,2 M

Les chromatogrammes sont imprégnés du réactif par pulvérisation, abandonnée à température ambiante pendant 1 heure, puis portés à 100°-105°C pendant 5 à 10 minutes.

- Réactif à l'oxalate d'aniline de PARTRIDGE (60)

Il se différencie du réactif précédent par la nature de l'acide destiné à transformer les oses en dérivés du furfural. On utilise ainsi un mélange à raison de 2 volumes d'une solution d'aniline dans l'éthanol absolu à 2 % avec 3 volumes d'une solution aqueuse d'acide oxalique à 2,5 % (60).

Les chromatogrammes sont pulvérisés comme précédemment puis maintenus à 100°C pendant 5 à 10 minutes.

La révélation au nitrate d'argent alcalin est très sensible et permet de mettre en évidence des quantités d'oses de l'ordre de microgramme. Cette technique n'est cependant pas spécifique et révèle toutes les substances réductrices. La révélation aux sels d'aniline est plus spécifiques mais moins sensible que la précédente (4 µg d'ose environ).

2) - Chromatographie quantitative sur papier

L'estimation des rapport molaires des oses est effectuée en appliquant la technique de WILSON (63) ou la technique de DATE (4).

Dans les deux techniques, la quantité de produit chromatographié doit être de l'ordre de 50 µg ou 250 nM de chaque ose. Après développement de la chromatogra-

phie dans un des systèmes solvants précédents, le chromatogramme est bien séché puis révélé. Pour cela, on utilise le réactif au phtalate d'aniline pour la technique de WILSON (63) tandis qu'on utilise le révélateur à base de citrate d'aniline pour la technique de DATE.

Des mêmes surfaces de papier, englobant très correctement chacune des taches, sont découpées puis extraites par l'éthanol chlorhydrique pendant une heure sous agitation continue. L'absorption des solutions est déterminée au spectrophotomètre ; des carrés de même surface que les précédents ne contenant pas de produit, servent de témoins. En déposant conjointement des quantités connues de solution de référence contenant les divers oses, on peut ainsi calculer la quantité d'oses dans les différents échantillons. Dans la technique de WILSON, la lecture s'effectue à 360 nm pour les hexoses et à 390 nm pour les pentoses, dans la technique de DATE la lecture est effectuée à 420 nm pour toutes les oses ; dans les deux techniques, la précision moyenne est de l'ordre de 10 à 12 %

3) - Chromatographie quantitative en phase gazeuse

Nous appliquons le protocole préconisé par FOURNET selon la technique de ZANETTA (65). L'échantillon doit contenir 250 à 500 μ g de glucides. Il est introduit dans un tube de 2 ml en pyrex "Sovirel" à fermeture étanche, lavé successivement deux fois avec 0,5 ml d'un mélange chloroforme/MeOH (2-1 v/v) puis deux fois avec 0,5 ml d'un mélange MeOH/chloroforme (2-1 v/v) et enfin avec du méthanol anhydre ; il est ensuite séché sous courant d'azote.

La lyophilisation s'effectue après addition de 50 μ g de méso-inositol qui sert de témoin interne, et de 0,5 ml d'eau distillée. Après une nuit dans un dessiccateur en présence d'anhydride phosphorique, le produit est soumis à une méthanolyse pendant 24 heures à 80°C en tube scellé avec le mélange HCl/MeOH 0,5 N en respectant une concentra-

tion finale de 1 0/00, puis le mélange est séché sous courant d'azote à la température du laboratoire.

Le résidu est repris par 200 μ l de dichlorométhane, additionné de 200 μ l d'anhydride trifluoroacétique puis porté à 150°C dans un bain de sable. Après refroidissement un échantillon de 4 μ l, correspondant à 4 μ g d'échantillon, est analysé par chromatographie en phase gazeuse.

Le chromatographe utilisé est un Aerograph 2100, muni d'une colonne en verre (300 x 0,3) remplie de Varaport 30 contenant 5 % de OV 210. La température est programmée de 100 à 230° C à raison de 1° C par minute, le débit du gaz vecteur (azote) étant de 7,5 ml/minute.

Cette technique est parmi les plus précises et permet de doser des quantités d'oses de l'ordre du microgramme.

4) - Dosage des oses neutres

La détermination et le dosage des oses neutres, soit par les méthodes colorimétriques, soit par les méthodes chromatographiques précédentes, est réalisée après hydrolyse chlorhydrique et selon les conditions préconisées par MONTREUIL et coll. (66). Pour chaque produit, on effectue une étude de la cinétique de libération des oses en fonction du temps de chauffage à 105°C et en tube scellé et en présence de HCl 2 M.

Le dosage des oses totaux est réalisé par la technique de DUBOIS et coll. (67) au phénol sulfurique. Nous avons utilisé cette technique en microméthode. L'échantillon doit contenir de 10 à 80 nM d'ose dans un volume réactionnel final de 1,5 ml. La reproductibilité de la technique est de 2 %.

L'estimation des oses réducteurs est effectuée

par la technique de PARK et JOHNSON (68), très sensible et qui permet de déterminer des quantités de l'ordre d'un microgramme d'ose.

Le dosage du glucose vrai est réalisé par la technique à la D-glucose-oxydase.

b) Analyse qualitative et quantitative des osamines

1) Analyse qualitative

a - Chromatographie sur papier Whatman 3 MM

Après développement des chromatogrammes dans un des systèmes solvants précédents, la révélation par la méthode au nitrate d'argent alcalin permet de mettre en évidence une tache au niveau de la glucosamine.

b - Séparation électrophorétique des osamines

La chromatographie sur papier dans les conditions précédentes ne permet pas de séparer les différentes osamines. L'électrophorèse à pH 9,2, selon FOSTER et coll. (69) en tampon boraté (tétraborate de sodium 23,4 g - soude 1 N 30 ml - Eau Q.s.p 1.000 ml) sur papier Whatman 3 MM, à 25 V/cm pendant 2h 30 permet de séparer les N-acétyl-osamines.

Nous avons appliqué cette technique et nous obtenons une séparation satisfaisante permettant de caractériser la présence des 3 N-acétyl-hexosamines : GlcNac, ManNac et GalNac. Cette technique nécessite une acétylation préalable des composés ; elle est réalisée pendant 20 minutes à la température du laboratoire, par l'anhydride acétique à 5 % dans un tampon pH 8, constitué par du bicarbonate de sodium en solution saturée.

La révélation spécifique des dérivés N-acétylés est effectuée par le réactif d'EHRlich (éthanol 210 ml -

para-diméthyl-amino-benzaldéhyde 3,2 G - HCl concentré 30 ml). Les chromatogrammes pulvérisés sont maintenus 5 à 10 minutes à l'étuve à 105°C.

2) Analyse quantitative des osamines

Les dosages des hexosamines totales ont été réalisés par la méthode d'ELSON-MORGAN selon le protocole préconisé par GHUYSEN et coll. (70). Cette technique colorimétrique est sensible et permet de mettre en évidence des quantités de l'ordre de 20 à 50 nM de glucosamine. Des études préalables de la cinétique de libération des osamines par de l'HCl 5,6 M en fonction du temps, nous permettent d'évaluer la teneur en osamine dans les conditions les meilleures. En effet, nous avons pu définir que, suivant les parois, c'est après 2 à 5 heures d'hydrolyse en tube scellé à 105°C que nous obtenons des résultats reproductibles.

c) Méthylation des oses neutres selon la méthode de HAKAMORI (71) et suivant le mode opératoire de FOURNET (72)

Un prélèvement de 125 mg de dispersion d'hydrure de sodium à 50 % dans l'huile minérale (Prolabo) est ajouté à 7,5 ml de diméthylsulfoxyde anhydre (Merck) et ce mélange est agité 15 minutes à la température du laboratoire sous courant d'azote. Il se forme du méthyl-sulfinyle carbanion suivant le schéma réactionnel :



Une prise d'essai de 30 mg de glycoprotéine contenant de 70 à 75 % d'oses neutres, est ensuite dissoute dans 1 ml de DMSO par agitation au Vortex jusqu'à dissolution totale, puis versée dans la solution de méthyl-sulfinyl carbanion. Il se forme un alcoolate par action du méthyl-sulfinyl carbanion sur les groupements hydroxylés :



Après 6 heures d'agitation sous courant d'azote à la température ambiante, on ajoute 1 ml d'iodure de méthyle et on laisse la réaction se poursuivre pendant 15 heures. L'alcoolate est alors estérifié par action de l'iodure de méthyle.



25 ml d'eau sont ajoutés à la solution et le produit méthylé est extrait 5 fois par 10 ml de chloroforme. Les extraits chloroformiques sont lavés par 20 ml d'une solution aqueuse de thiosulfate de sodium à 1 % et séchés sur sulfate de sodium anhydre puis évaporés sous vide à l'évaporateur rotatif. Tout ce protocole est recommencé 3 fois depuis le traitement par le sulfinyl carbanion. Les phases chloroformiques finales séchées et évaporées sont reprises par 1 ml du mélange chloroforme/éthanol 1:1 v/v qui est passé sur gel de Sephadex LH 20, colonne de 2 x 50 cm. L'élution est réalisée avec un mélange chloroforme/éthanol 1:1 v/v/ Le repérage des constituants glucidiques présents dans l'effluent s'effectue par la méthode colorimétrique de DUBOIS et coll. (67).

Les fractions positives sont rassemblées et séchées à l'évaporateur rotatif. Le résidu est conservé sous P_2O_5 dans un dessiccateur pendant 24h. Les produits sont alors hydrolysés par de l'acide chlorhydrique 4 N à 100°C pendant 4h et soumis à l'électrophorèse préparative sur papier Whatman 3 MM en tampon de MICHL (73) de pH 3,9, 10 V/cm pendant 4h. La révélation des bandes latérales par le réactif à l'oxalate d'aniline de PARTRIDGE (60) et par le réactif à la ninhydrine, permet de localiser la bande basique des O-méthylsamines et la bande neutre des mono-saccharides neutre-O-méthylés. Ces deux fractions sont éluées selon la méthode de DENT (74) et les éluats sont évaporés à sec sous pression réduite.

Analyse de la bande basique : Les osamines méthylées, libé-

rées par hydrolyse chlorhydrique des glycoprotéines perméthylées et isolées par électrophorèse préparative, sont triméthylsilylées selon le procédé de SWEELEY et coll. (75) ; la fraction est reprise par 0, 1 ml de pyridine anhydre que l'on additionne de 50 μ l d'hexaméthyl-disilazane et 50 μ l de triméthylchlorsilane.

Le mélange est agité pendant 15 minutes ; puis séché sous courant d'azote. Le résidu est repris par 1 ml d'heptane et la solution est centrifugée. Le surnageant est séché sous courant d'azote. Le résidu sec est enfin repris par 50 μ l d'heptane et 1 μ l de cette solution est soumis à la chromatographie en phase gazeuse dans les conditions suivantes :

Colonne de verre de 0,3 x 170 cm remplie de Chromosorb w A w HMDS (100-120 mesh) contenant 3 % en poids de silicone OV 17, débit du gaz vecteur (azote) 7,5 ml/mn, température de la colonne 120°C.

Analyse de la bande neutre : La bande neutre qui contient les oses méthylés, est éluée ; l'éluat est évaporé à siccité et conservé une nuit dans un dessicateur contenant du P_2O_5 . Après pesée du résidu, celui-ci est soumis à la méthylglycosylation ou méthanolyse au bain-marie bouillant pendant 8 heures par le méthanol chlorhydrique 0,5 M respectant un pourcentage de 1 % de produit et réactif.

Après refroidissement et évaporation sous vide, le résidu est repris par le méthanol puis soumis à l'analyse chromatographique en phase gazeuse. La colonne utilisée est une colonne de verre 0,3 x 180 cm remplie de Chromosorb w A w (mesh 60 à 80) contenant 3 % de carbowax 6000 ; la température de la colonne est programmée de 150° C à 190° C à raison de 1°C/minute, le gaz vecteur (azote) ayant un débit de 7,5 ml/minute.

d) Oxydation périodique

L'oxydation périodique a été effectuée suivant la technique de GLICK et coll. (76) : 25 mg de produit dissous dans 6 ml d'eau distillée sont traités par 4 ml de métapériodate de sodium 0,086 M et 15 ml de tampon acétate de sodium 0,1 M de pH 5. Le mélange est maintenu à l'obscurité à + 4°C. La consommation d'acide périodique est déterminée en suivant régulièrement l'absorbance de la solution en U V à 310 nm (77.). Au bout de 6 à 12 heures, l'absorbance est en général stabilisée.

La solution est ensuite déminéralisée sur des colonnes de Dowex 50 x 8 forme acide et de Duolite A 102 forme acétate. La solution effluente et les eaux de rinçage des colonnes sont concentrées sous pression réduite.

e) Analyse des acides aminés

Afin de préciser la masse moléculaire moyenne des protéines, ce qui nous conduit à une appréciation plus exacte de la quantité de substrat à introduire dans l'auto-analyseur, nous avons procédé à la détermination des groupements aminés terminaux. Cette détermination est réalisée par le réactif au 2,4 dinitrofluorobenzène (78) avant ou après hydrolyse chlorhydrique 6 M pendant 15 à 18 heures en tube scellé à 110° C. Nous utilisons une microméthode en opérant sur une prise d'essai comprise entre 1 et 100 nanomoles de $-NH_2$ libre.

Le dosage des aminoacides est effectué par chromatographie à l'autoanalyseur Technicon, colonne 0,6 x 130 cm, selon le procédé général de PIEZ et MORRIS (79). Les quantités déposées varient de 5 à 15 mg selon la teneur réelle du produit en protéines.

D - TECHNIQUES PHYSICO-CHIMIQUES

a) Filtration moléculaire sur gel

Nous avons utilisé des colonnes en verre (180 x 2 cm) pour les gels Sephadex G 50 - G 25 et des colonnes type Sephadex K 26/70 pour les gels G 100 et G 75. Les colonnes sont chaque fois montées en série.

La quantité de produit déposé est de l'ordre de 500 mg dans le cas du Sephadex G 50 - G 25 et 200 mg dans le cas du Sephadex G 100 - G 75.

Le repérage des constituants des fractions élués est réalisé par la recherche des groupements aminés au dinitrofluorobenzène (78) et par le dosage des oses au phénol sulfurique de DUBOIS (67).

b) Examen aux Rayons X

L'examen aux rayons X pour la caractérisation de la chitine a été effectué selon la méthode de SEEMAN-BOHLIN en utilisant un rayonnement $K\alpha$ du cobalt. Le produit est monté en couche mince dans du collodion ou entre deux morceaux de ruban adhésif transparent.

c) Microscopie électronique

Les parois ont été fixées par OsO_4 à 2 % puis incluses dans l'Epon. Les coupes fines ont été contrastées au citrate de plomb et examinées avec un appareil Siemens Elmiskope IA, réglé à 80 KV (7).

d) Spectroscopie infra-rouge

Les échantillons sont incorporés dans une pastille de bromure de potassium puis le spectre est déterminé dans un appareil Perkin-Elmer 337.

e) Ultracentrifugation

L'ultracentrifugation a été effectuée dans un appareil Beckman E en opérant à 20°C. La concentration du

produit est de 10 mg/ml. La vitesse de régime (56.000 tours/minute) est atteinte après 7 minutes.

f) Electrophorèse

Les électrophorèses sont effectuées soit dans une cuve en toit, soit dans une cuve ordinaire. Elles sont réalisées sur papier Whatman 3 MM pendant 2 à 3 heures. A pH acide, nous avons utilisé le tampon de MICHL (73) : pyridine-acide acétique-eau (2 - 6 - 1000 v/v/v). A pH basique, nous avons utilisé un tampon de pH 9,2 à base de tétraborate de sodium - soude - eau.

La révélation des oses est effectuée par le réactif au nitrate d'argent alcalin (61). Les groupements aminés sont révélés soit par le chlore benzidine (80), soit par la pulvérisation d'une solution de ninhydrine à 0,5 % dans le butanol.

E - TECHNIQUES ENZYMATIQUES

Tous les traitements enzymatiques ont été effectués à 37°C pendant 24 heures sous agitation douce intermittente. Nous avons vérifié qu'au-delà de cette durée, l'action était négligeable.

Pour éviter des interférences d'origine microbienne, des témoins ont toujours été incubés en parallèle. Lorsque deux traitements se suivent, les produits sont soumis à trois lavages à l'eau distillée avant d'être incubés avec le système enzymatique suivant.

a) Traitement par l'hélicase

Le suc digestif d'*Helix pomatia* (Industrie biologique Française) a été utilisé en tampon acéto-acétate 0,05 M, pH 5,5 ; pour un volume final de 1 ml contenant 2 mg de produit, on utilise 50 μ l de suc digestif d'*Helix pomatia*.

b) Chitinase

Nous avons utilisé la chitinase (chitine glycano-hydrolase Calbiochem) dans un tampon acéto-acétate 0,05 M pH 5,2. Pour 2 mg de produit on utilise 0,3 ml d'une suspension d'enzyme à 2 % dans un volume réactionnel de 0,9 ml, soit une concentration de 170 μ g d'enzyme pour 1 mg de produit.

c) α -D glucosidase et β -D glucosidase (Sigma)

Ces deux enzymes ont été respectivement utilisées en tampon acéto-acétate 0,05 M, pH 5,2 et dihydrogénéphosphate de potassium - hydroxyde de sodium 0,05 M, pH 6,8. Pour un volume réactionnel de 400 μ l contenant 2 mg de produit, on utilise 50 μ l d'une solution d'enzyme à 1 μ g/ μ l soit une concentration de 25 μ g d'enzyme par mg de produit.

d) "Complexe β glucannase"

Le "Complexe β glucannase" a été préparé à partir du suc d'*Helix pomatia* par filtration sur Sephadex G 100 selon le protocole décrit par ANDERSON et coll. (81). La fraction exclue du gel, après une seconde filtration sur G 100, est dépourvue d'activité α glucanasique et chitinasique, mais possède une activité β glucannasique et phosphodiésterasique. Ce complexe a été utilisé à raison de 25 μ g pour 1 mg de produit en opérant en tampon acéto-acétate de pH 5,5 dans un volume réactionnel de 0,5 ml.

e) Traitement par le lysozyme

Le lysozyme (Calbiochem) a été utilisé en tampon phosphate 0,05 M, pH 6,2, à une concentration de 400 μ g par mg de produit à traiter.

f) Traitement par la pronase

Le pronase (Calbiochem) a été utilisée en solution carbonate acide de sodium 0,5 M de pH 8 à une concentration de 50 μ g d'enzyme par mg de produit à traiter.

g) Traitement par la cellulase

La cellulase (Worthington) a été utilisée en

tampon acéto-acétate 0,05 M, pH 5,5 à une concentration de 500 μ g par mg de produit à hydrolyser. Cette préparation contient à côté d'une action β 1 $\longrightarrow$ 4 osidasique, une action β 1 $\longrightarrow$ 3 osidasique comme l'atteste son action positive sur la laminarine.

P R E M I E R E P A R T I E

ETUDES MORPHOLOGIQUES, CHIMIQUES ET ENZYMATIQUES

DES PAROIS DE LEVURES DU GENRE RHODOTORULA

CHAPITRE I

OBTENTION DES PAROIS DE LEVURES :

RENDEMENT SUIVANT LE MILIEU DE CULTURE, ASPECT MORPHOLOGIQUE

De nombreux facteurs, en particulier les conditions de culture et l'âge des cellules ont une influence sur le métabolisme cellulaire ; cette influence se répercute en particulier sur la morphologie des parois (82).

Pour mieux analyser ce phénomène, dans le cas des levures Rhodotorula étudiées, nous avons cultivé celles-ci dans deux types de milieux nutritifs différents D et V (voir Matériels et Méthodes) dont les caractéristiques essentielles sont représentées dans le tableau 2 suivant :

Tableau 2

Caractéristiques essentielles des constituants des deux milieux
D et V

Nature du constituant	Glucose	Saccharose	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	H_2KPO_4
Milieu D	40	-	-	1
Milieu V	-	20	3	2

Teneur exprimée en g/l de milieu.

Comme nous le constatons, le milieu D est plus riche en glucide et moins riche en phosphore que le milieu V, mais ce dernier est plus riche en source azotée. Cette différence permet d'analyser l'influence spécifique de la variation de la teneur en azote et carbone.

I - Influence du milieu de culture sur la croissance des levures et le rendement en parois

Les courbes de croissance établies en mesurant l'extrait sec (Fig. 4) montrent qu'après 4 jours de culture, les levures sont en phase stationnaire ; ceci est valable pour les trois souches étudiées et pour les deux milieux D et V.

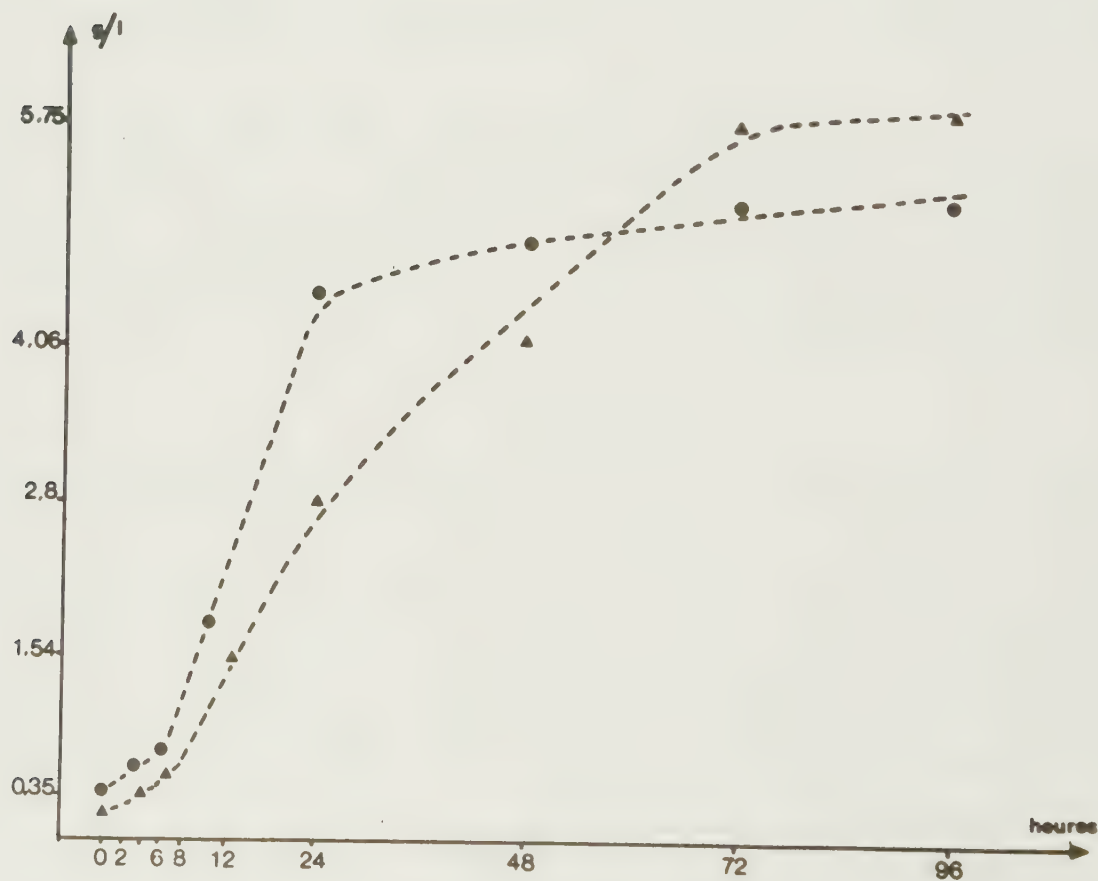


Fig. 4 : Courbes de croissance de Rhodotorula rubra
-▲-▲-▲ : milieu D
-●-●-● : milieu V

Dans ces conditions, les trois souches Rh. rubra, Rh. glutinis 3044, Rh. aurantiaca 2200 cultivées dans l'un ou l'autre des deux milieux, sont fortement colorées en rouge du fait de la présence des caroténoïdes.

La souche Rh. glutinis 3044 excrète des lipides lorsqu'elle est cultivée sur milieu D (52).

Ainsi, afin de pouvoir travailler toujours dans les mêmes conditions, nous avons effectué toutes nos études sur des levures cultivées pendant 4 jours.

La croissance des levures Rhodotorula varie non seulement suivant la souche mais aussi suivant le milieu nutritif. Dans le tableau 3, nous avons rassemblé le rendement en biomasse et parois lyophilisées des trois souches de levures cultivées dans les deux milieux D et V

Tableau 3

Rendement en biomasse et en parois suivant le milieu de culture D ou V, pour les trois souches de Rhodotorula après 4 jours de culture.

Souche	RMP	3044	2200
Milieu	D : V	D : V	D : V
Biomasse sèche après broyage	3,2 : 4,2	3,8 : 2	3,5 : 5
Masse de parois après lavage et lyophilisation	0,56 : 0,87	0,31 : 0,21	0,81 : 1
Rendement $\frac{\text{paroi}}{\text{biomasse}}$ en %	17 : 20	8 : 10	23 : 20

- Les résultats sont exprimés en g/l de milieu, ils sont la moyenne de deux expérimentations.

D'après ces résultats, nous constatons que ce sont les souches RMP et 2200 qui possèdent le meilleur rendement en parois, la souche Rh. glutinis 3044 fournissant un rendement environ deux fois plus faible.

A l'examen au microscope en contraste de phase, les parois des souches Rh. rubra RMP et surtout Rh. glutinis 3044 cultivées sur milieu V paraissent moins épaisses que celles des parois de levures cultivées sur milieu D. Les parois de la souche Rh. aurantiaca 2200 ont le même aspect après culture sur le milieu D ou V.

L'examen au microscope électronique montre que les parois apparaissent bien homogènes et exemptes de contaminants d'origine cytoplasmique. Cet examen révèle également des différences dans la morphologie des parois.

La structure des parois de la souche RMP paraît très différente suivant qu'il s'agit d'une culture sur milieu D ou V (planche I). Si l'épaisseur totale est semblable (tableau 4), il est cependant à noter que la gaine, caractérisée par sa formation diffuse et lâche, moins dense aux électrons et non séparable de la paroi, est plus importante après culture des cellules sur le milieu D.

Tableau 4

Epaisseur des parois des 3 souches de Rhodotorula cultivées sur les milieux D et V (moyenne d'une vingtaine de mesures)

Souche	RMP		3044		2200	
Milieu	D	V	D	V	D	V
Epaisseur en Å	1070	1160	530	880	1170	1110

Pour la souche 3044 (Planche II), la gaine est peu importante, les enveloppes sont au total plus minces

que précédemment mais l'épaisseur varie fortement suivant que les cellules sont cultivées sur milieu D ou V (tableau 4).

Quant aux parois de la souche 2200, nous constatons la présence de cavités transparentes aux électrons, petites et régulières sur milieu V, plus grandes et difformes sur milieu D (planche III). L'épaisseur totale dans les deux sortes de parois reste invariable.

PLANCHE I

Parois de levure Rhodotorula rubra après 4 jours de culture.

Clichés 1 - 2 - 3 : Cellules cultivées sur milieu D
p (parois), g (gaine).

Cliché 4 : Les flèches indiquent des zones dont la structure présente des différences relatives, par rapport aux autres endroits de la paroi.

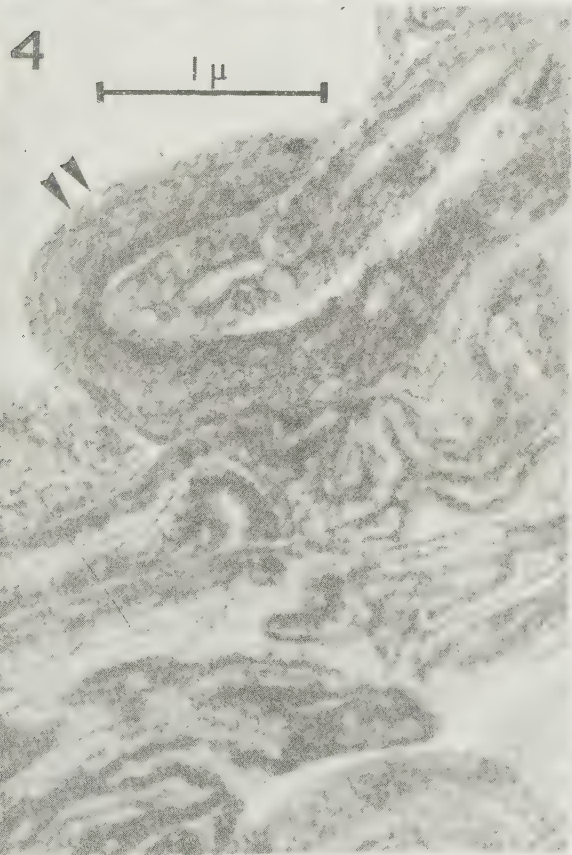
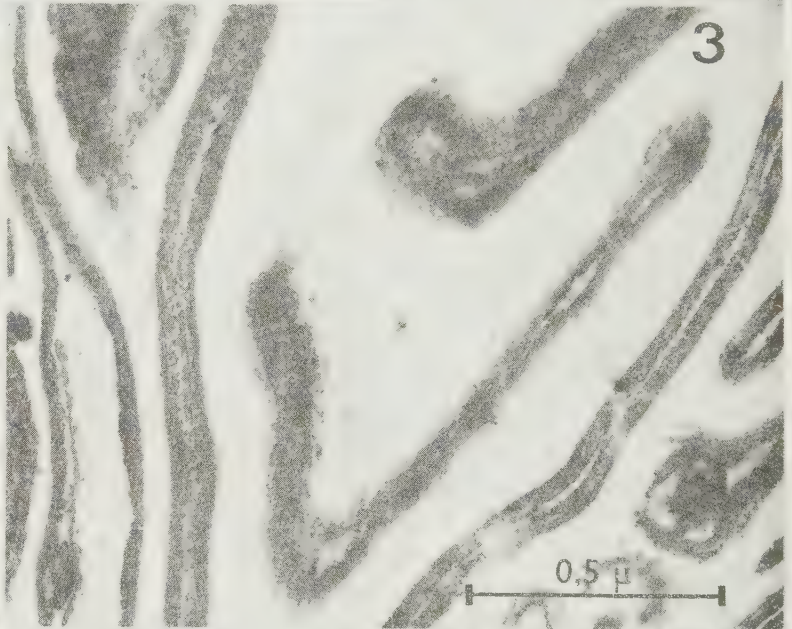
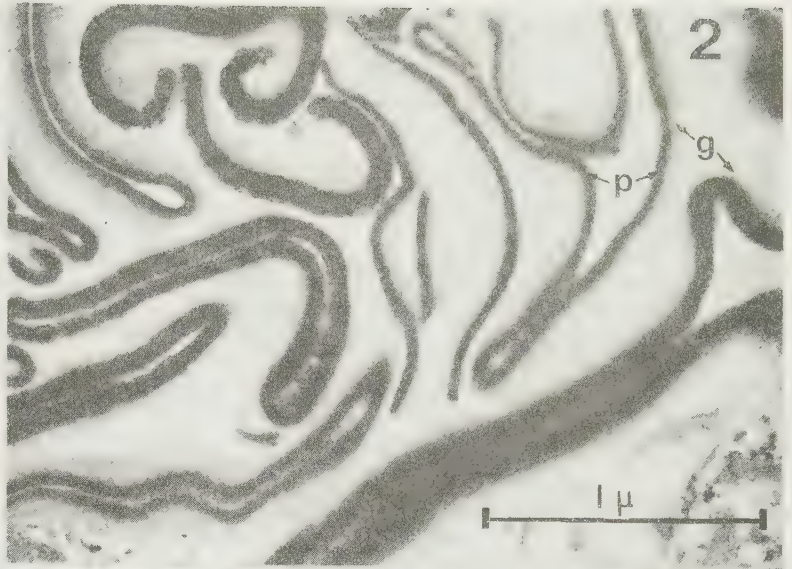
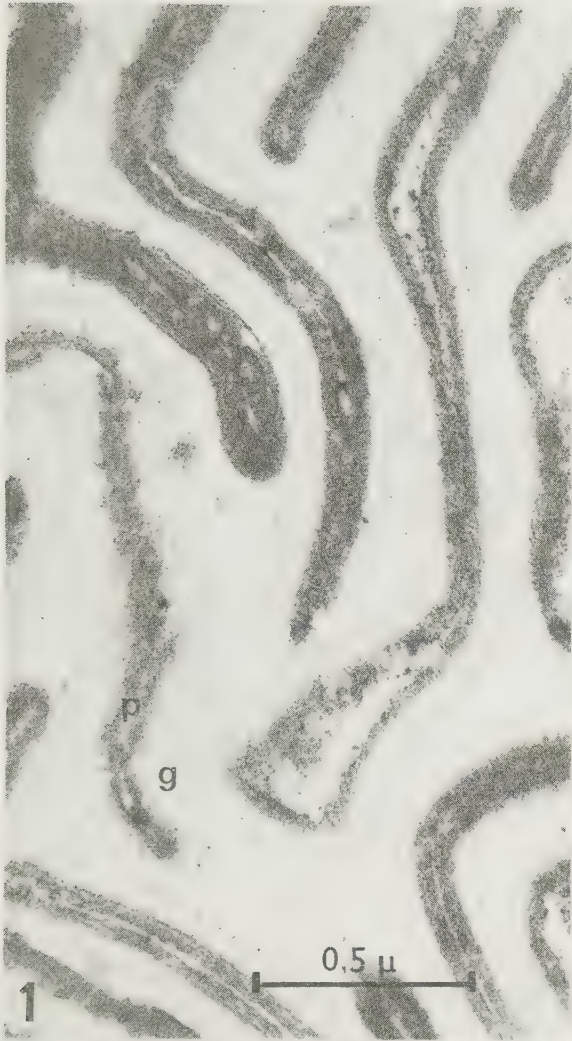


PLANCHE II

Parois de levures Rhodotorula glutinis 3044
après 4 jours de culture.

Clichés 6 - 7 - 8 : Cellules cultivées sur milieu D;

(Cliché 6) : les flèches indiquent la "bordure diffuse"

Cliché 9 : Cellules cultivées au milieu V.

Les flèches indiquent les zones plus claires dans la paroi.

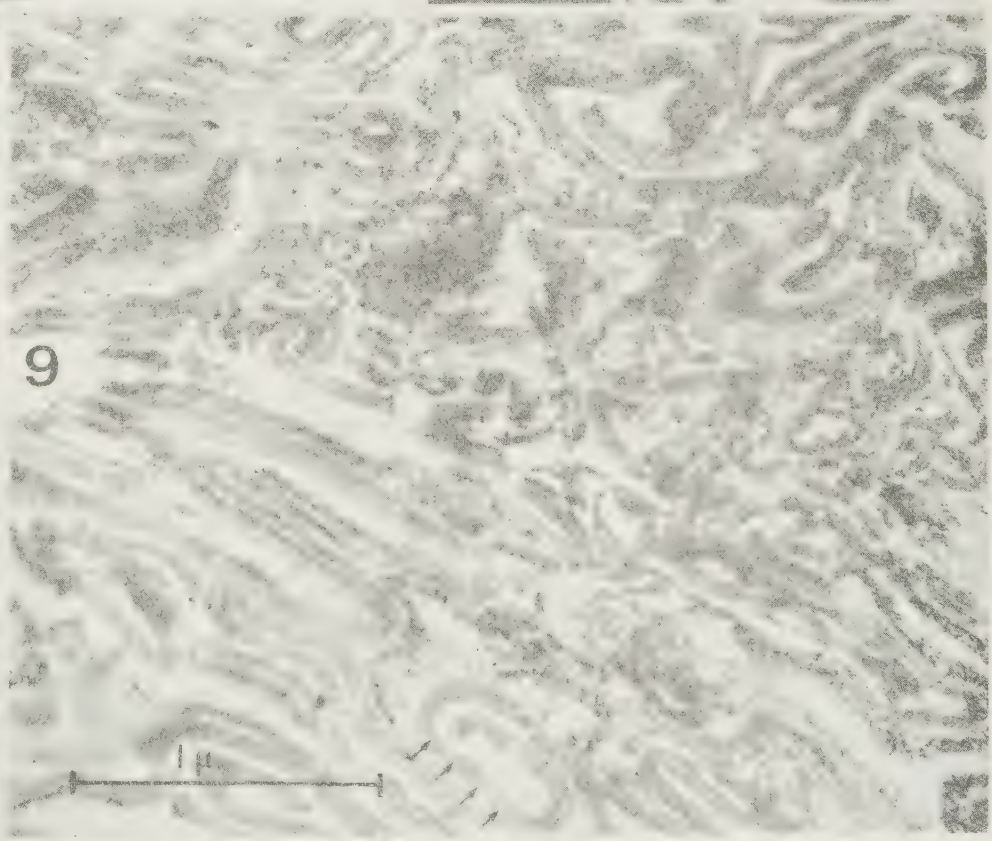
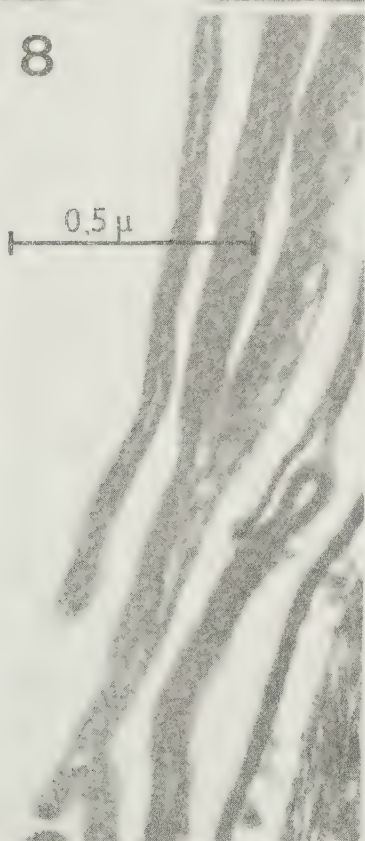
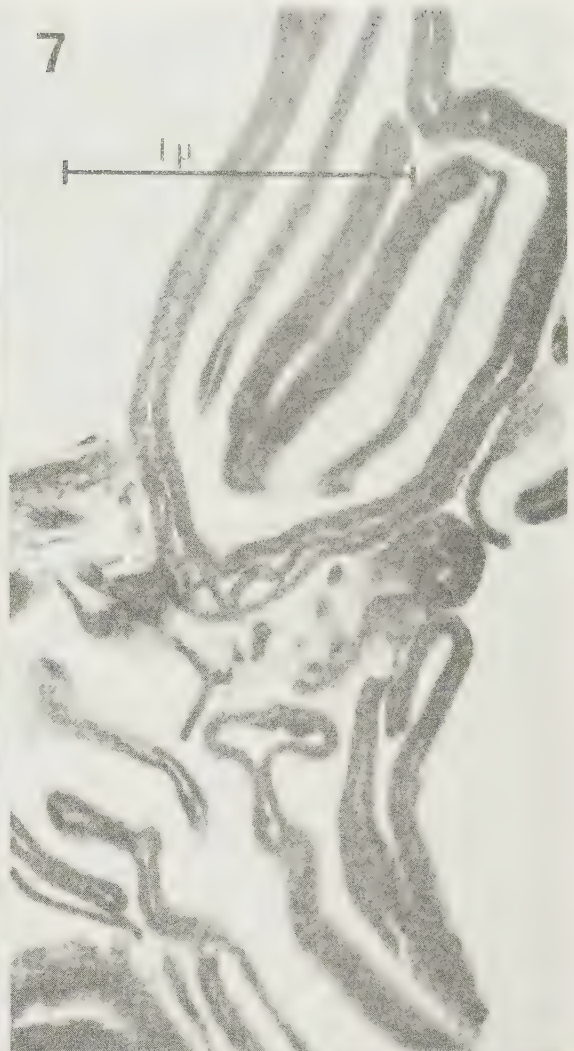
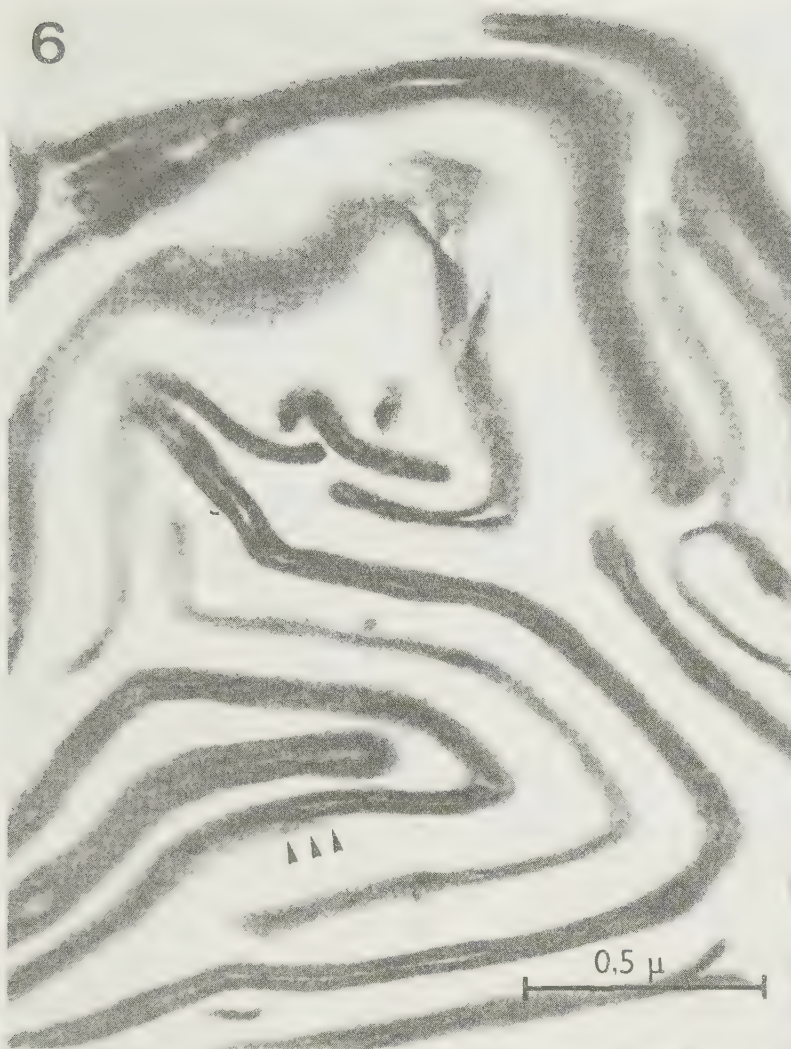


PLANCHE III

Parois de levure Rhodotorula aurantiaca 2200
après 4 jours de culture.

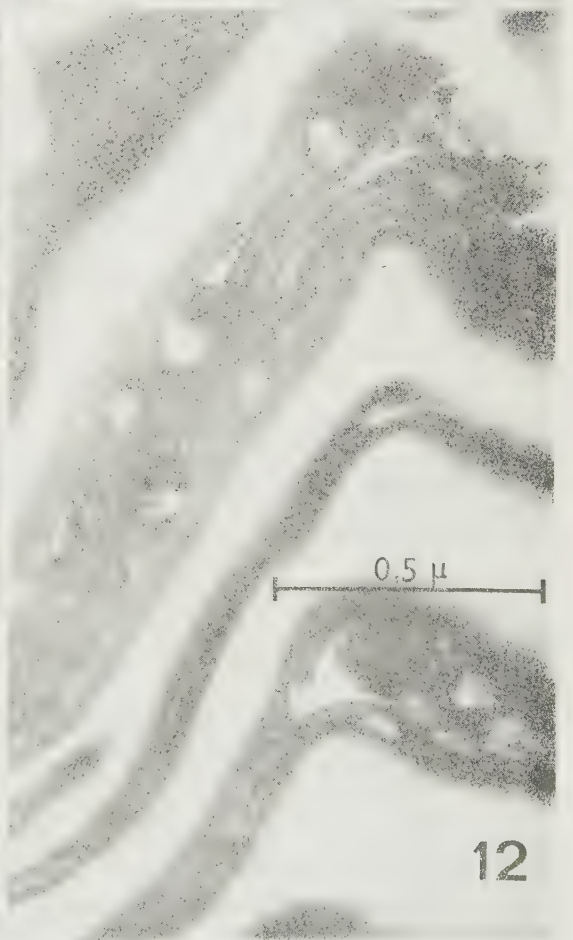
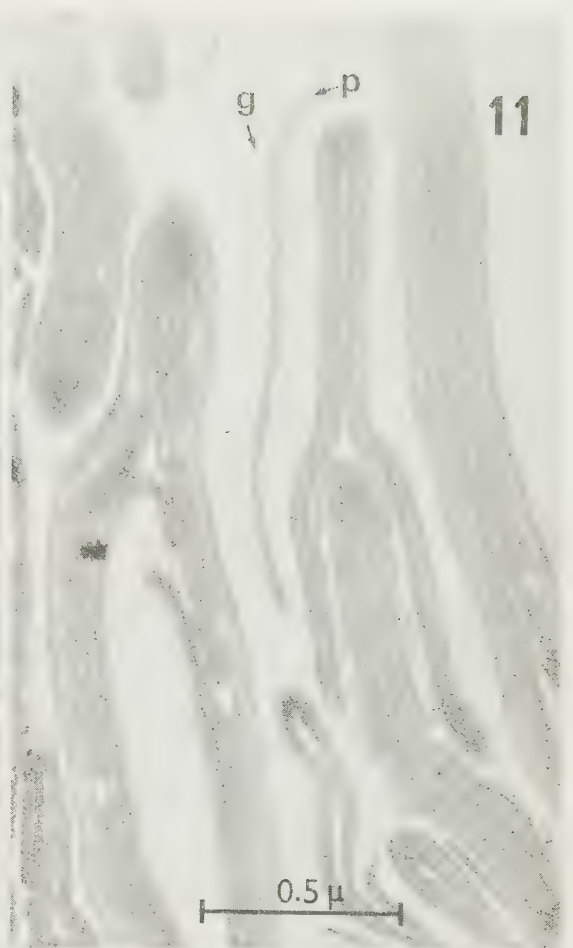
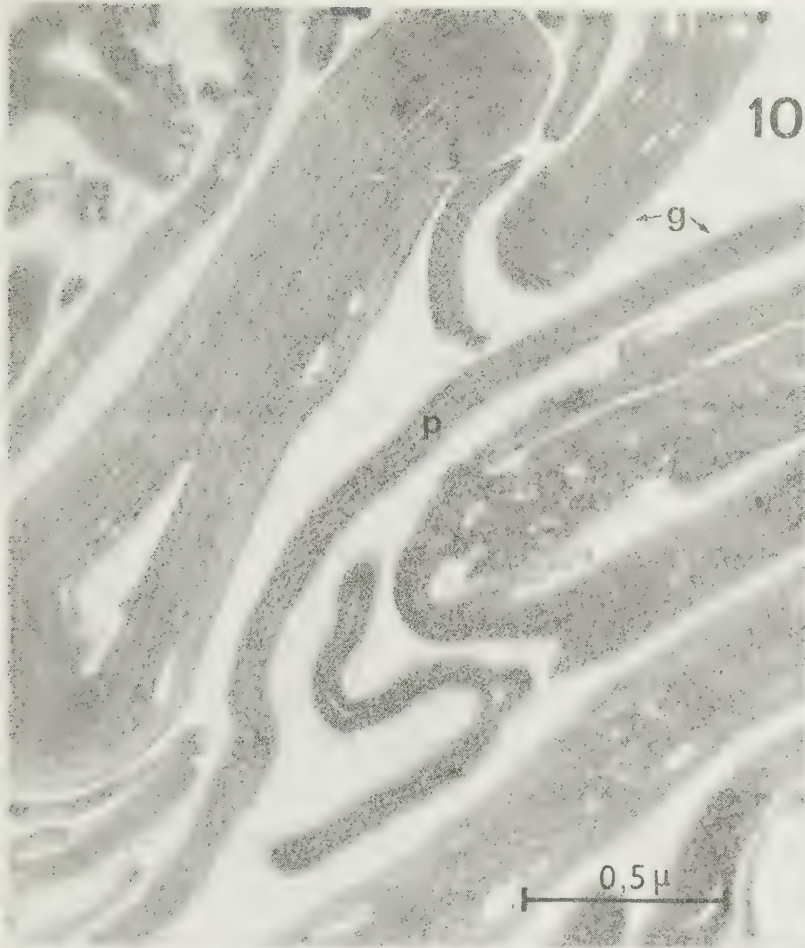
Clichés 10 - 11 - 12 : Cellules cultivées sur milieu D.

Cliché 13 : Cellules cultivées sur milieu V.

c = cavité

p = paroi

g = gaine



CHAPITRE II

COMPOSITION CHIMIQUE DES PAROIS DES LEVURES SELON LE MILIEU DE CULTURE

De nombreux composés qui s'associent entre eux pour constituer les parois de levures ont déjà été déterminés par des travaux antérieurs tels ceux de NORTHCOTE et HORNE (83), ROELOFSEN (84), FALCON et NICKERSON (38), EDDY (46) et GROOK et JOHNSTON (50). Aussi est-il bien admis actuellement que les parois des levures sont constituées de polysaccharides (glucannes et mannanes et parfois gluco- ou galacto-mannanes , de protéines, de lipides et de chitine.

Les travaux les plus anciens sur les parois des levures ont consisté à isoler à partir de cellules entières des complexes macromoléculaires, surtout de nature polysaccharidique, en appliquant soit des traitements alcalins, soit des traitements acides.

C'est ainsi que BELL et NORTHCOTE (85) ont isolé des glucannes à partir des levures entières de Saccharomyces cerevisiae en les traitant par l'acide acétique 0,5 N à 75°C.

HAWORTH et coll. (29) (30) ont extrait des mannanes des levures entières (Saccharomyces cerevisiae) par traitement avec une solution d'hydroxyde de sodium à 6 % et en opérant à 100°C.

BISHOP et coll. (86) puis YU et coll. (87) ont

isolé des parois de Candida albicans deux types de polysaccharides, glucannes et mannanes , après traitement par l'hydroxyde de sodium à 3 % et à 100°C.

Toutefois, PEAT et coll. (88) (31), estimant que la soude pouvait entraîner une dégradation des mannanes de parois de Saccharomyces cerevisiae, ont par conséquent tenté d'isoler ces polymères à l'aide d'un tampon citrate de sodium à pH 7 et en opérant à 75°C.

Par ailleurs, des produits de nature glycoprotéique ont été également isolés, c'est ainsi que KORN et NORTHCOTE (40) après traitement des parois de Saccharomyces cerevisiae par l'éthylène diamine ont obtenu des polysaccharides et des glycoprotéines dont ils ont étudié les caractères et la composition chimique.

La détermination de la composition chimique brute des parois des microorganismes constitue seulement la première étape avant de procéder à l'étude structurale.

L'étude quantitative et qualitative des constituants des parois est en général conditionnée par une mise en solution des polymères constitutifs et par leur clivage en éléments plus petits, plus accessibles à l'étude. Pour réaliser ces clivages il convient d'éviter au maximum la dégradation des systèmes par un choix approprié des méthodes.

Il est évident, comme l'ont montré de nombreux travaux, que les composants et surtout les complexes macromoléculaires sont différents d'une espèce de levure à l'autre et parfois d'une souche à une autre. Toutefois, pour une même espèce, la composition chimique et la nature des complexes peuvent varier non seulement suivant le milieu nutritif, mais aussi selon la morphologie des microorganismes, c'est-à-dire suivant que l'organisme se trouve sous la forme levure ou mycelium.

I - COMPOSITION CHIMIQUE DES PAROIS

Chez S. cerevisiae, Mc MURROUGH et coll. (89) ont montré des modifications de la structure de la paroi selon la richesse du milieu nutritif en source carbonée ou azotée ; lorsque le milieu est riche en glucose, la paroi contient davantage de glucannes que de mannanes, et par ailleurs si le milieu est pauvre en source azotée, la paroi renferme moins de copule protéique.

Nous avons vu dans le chapitre précédent que les milieux de culture D et V diffèrent par leur teneur en source azotée, en hydrate de carbone et en ions orthophosphate. Aussi, pouvait-on espérer que si l'on observait une variation dans la composition chimique des parois, cette modification reflèterait la différence des milieux de culture.

a) Teneur en azote total

En ce qui concerne les trois souches de Rhodotorula étudiées, les résultats rapportés dans le tableau 5 montrent que la teneur en azote est variable et représente entre 0,7 et 1,3 % de la masse des parois. Ces valeurs sont plus faibles que celles obtenues pour d'autres parois de levures telles celles du genre Candida sous la forme mycélienne 2,2 % (4), ou celles du genre Nadsonia 1,7 % (90), ou encore celles du genre Saccharomyces 2 % (12).

Tableau 5

Teneur en azote et en phosphore des parois de levures Rhodotorula après 4 jours de culture en milieu D et V.

Souche	RMP		3044		2200	
Milieu	D	V	D	V	D	V
Phosphore	0,55	0,54	0,46	0,85	0,38	0,52
Azote total	11	10	9	13,5	7,9	7,6

- Résultats exprimés en $\mu\text{g}/\text{mg}$ de parois lyophilisées
- Les résultats ci-dessus sont la moyenne de deux expérimentations sur deux lots de parois différents.
- Fluctuation des résultats 6 à 8 %
- Le dosage de l'azote total (91) a été réalisé avec l'appareil de Parnass et Wagner après minéralisation de 200 mg de parois par H_2SO_4 en présence de catalyseur de Dumazert.
- Le phosphore total a été déterminé par la méthode au molybdate d'ammonium sur 1 mg de parois après minéralisation sulfonitrique.

La teneur en azote total dans les parois des trois souches de levures du genre Rhodotorula étudiées ne reflète pas d'une manière nette la composition du milieu. En effet, le milieu V est nettement plus riche en source azotée que le milieu D, seules les parois de la souche

Rh. glutinis 3044 contiennent une teneur azotée globale plus élevée lorsque les levures sont cultivées sur ce milieu.

Pour les deux autres souches, on ne peut pas constater de différence notable.

b) Teneur en phosphore

La quantité de phosphore est apparemment plus faible que celle rapportée chez d'autres levures. Le taux de phosphore s'avère le même pour la souche Rh. rubra RMP cultivée sur le milieu D ou V, mais en ce qui concerne les deux autres souches, c'est la culture sur milieu V qui fournit des parois dont la teneur en phosphore est plus élevée (tableau 5). Notons que cela provient probablement du fait que ce milieu est plus riche en ions orthophosphates ; ceci ne peut être dû à une contamination venant du milieu en raison de la fiabilité des lavages.

c) Teneur en hexosamine

La teneur en hexosamine (5 à 15 %) comme le montre le tableau 6 est plus élevée que celle signalée pour d'autres souches telle Candida albicans 2,9 % (4), Saccharomyces fragilis 1 à 1,2 % (12). Dans l'ensemble de la littérature, on constate que la teneur en hexosamine dans les parois des levures Ascomycètes est en moyenne de 1 à 2 % (18) ; cependant, pour certaines souches de levure du genre Nadsonia, Sporobolomyces et pour les levures filamenteuses, cette teneur dépasse ces limites et atteint une valeur de 9 %.

Tableau 6

Teneur en oses neutres, hexosamines et groupements aminés dans les parois de Rhodotorula

Souches	RMP		3044		2200	
Milieu	D	V	D	V	D	V
Oses neutres	4200	4400	3800	3927	4150	4220
Hexosamine	255	370	240	745	406	616
Groupe ment aminé	1658	825	1266	958	1158	850

- Résultats exprimés en nM/mg de parois lyophilisées.
- Les résultats ci-dessus sont la moyenne de 3 expérimentations sur deux lots différents de parois.
- Dosage des oses neutres effectués après hydrolyse chlorhydrique 2 M pendant 2 heures, par la technique au phénol sulfurique de Dubois, résultats exprimés en glucose.
- Hexosamines dosées par la réaction de Morgan-Elson et exprimées en glucosamine.
- Groupements aminés, exprimés en alanine, dosés par la technique du dinitrofluorobenzène.

Les parois de levure du genre Rhodotorula ne libèrent pas facilement les hexosamines par hydrolyse et l'étude de la cinétique de l'hydrolyse par l'acide chlorhydrique 5,6 M indique que le maximum de libération de ces

produits se situe entre 2 et 5 heures. En effet, la figure 5 nous montre que le maximum de libération des hexosamines pour la souche RMP cultivée sur milieu V se trouve après 5 heures tandis que celle du milieu D se situe après 2 heures.

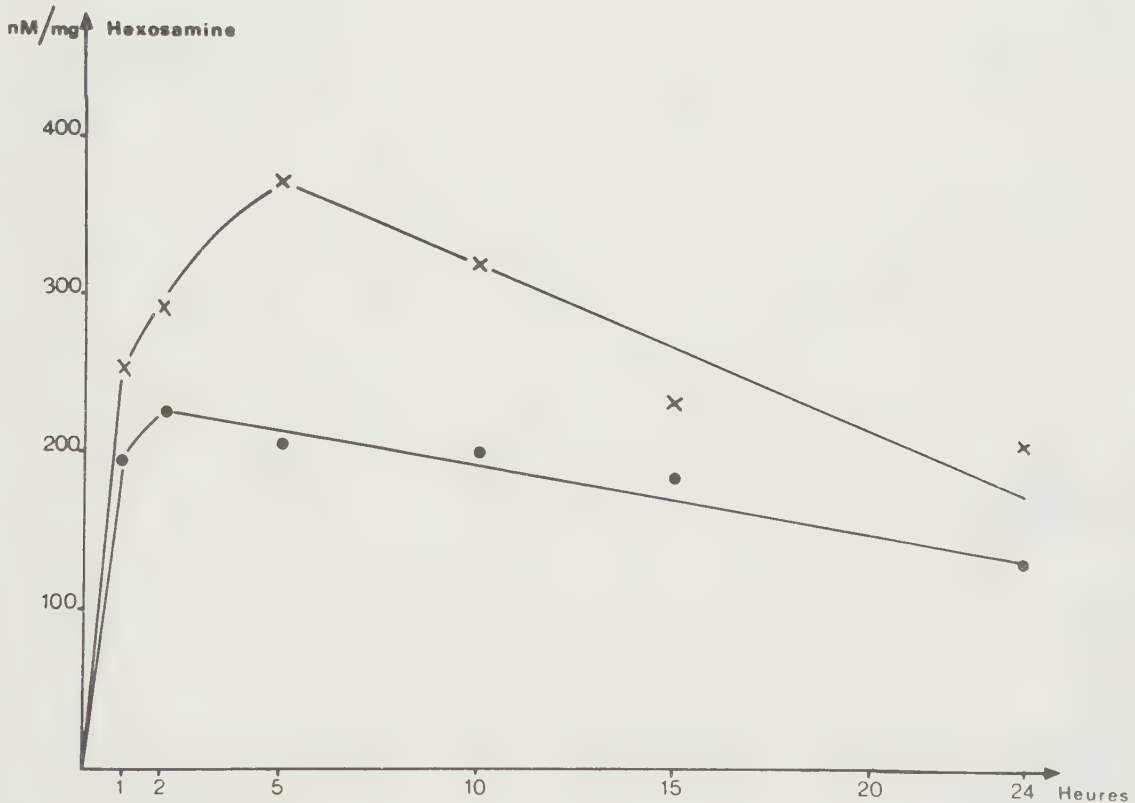


Fig. 5 : Courbe de la cinétique de libération des hexosamines après hydrolyse chlorhydrique 5,6 M en fonction du temps.

x x x x : Parois de la souche RMP après culture sur milieu V

• • • • : Parois de la souche RMP après culture sur milieu D.

Nous avons vu précédemment que les parois de levure contiennent une partie peptidique. La libération des acides aminés obtenue par hydrolyse acide révèle que les groupements aminés sont libérés totalement après une durée de 5 à 15 heures. Comme nous pouvons le constater dans le tableau 7, ce sont les parois de levures cultivées sur milieu D qui renferment la teneur la plus élevée en azote protéique calculée (valeur estimée par différence entre l'azote total des parois et l'azote de la glucosamine). Or, nous avons vu ci-dessus que la teneur en azote total dans les parois ne reflète pas la différence dans la composition azotée des milieux D et V puisqu'il se produit une relative compensation entre la teneur en azote protéique et la teneur en azote des hexosamines.

Tableau 7

Teneur en azote total et protéique dans les parois de levures Rhodotorula

Souche	RMP	3044	2200
Milieu	D : V	D : V	D : V
Azote total	11 : 10	9 : 13,5	7,9 : 7,6
Azote hexosamine	1,9 : 3	3 : 7,5	2 : 2,1
Azote protéique	9,1 : 7	7 : 6	5,9 : 5,5

- Valeurs exprimées en $\mu\text{g}/\text{mg}$ de parois.
- Azote hexosamine calculé d'après la teneur en hexosamines totales.
- Azote protéique calculé : azote total - azote hexosamine.

Des variations semblables (de la teneur en azote et en protéine) en fonction du milieu nutritif ont déjà fait l'objet d'investigations chez Saccharomyces cerevisiae : c'est ainsi que POWER et coll. ont montré que la teneur globale en protéine dans les parois est plus faible lorsque cette levure est cultivée sur milieu déficient en inositol (92) ; on assiste alors à une augmentation du taux des hexosamines, il apparaît donc ici pour les levures Rhodotorula que la baisse de la copule protéique est partiellement compensée par une augmentation en hexosamines.

En ce qui concerne les glucides, l'étude doit se faire après une hydrolyse par l'acide chlorhydrique 2 N, pendant 2 heures ou par l'acide sulfurique N et en respectant les conditions indiquées par MONTREUIL et coll. (66). Dans ces conditions d'hydrolyse, la dissolution des parois n'est pas totale. Les éléments éliminés sont des oligosides. Le dosage des oses totaux par la méthode de DUBOIS (67) au phénol sulfurique permet de donner une valeur de la teneur globale des oses sans qu'il soit possible de préciser la nature et la teneur des différents oses constitutifs. Cette valeur qui varie de 70 à 80 % selon le milieu est comparable aux valeurs déjà signalées pour d'autres souches telles Nadsonia (90), Saccharomyces (12), ou Paracoccidïoides brasiliensis (93).

Pour approfondir l'étude de la structure glucidique des parois de levures, il est important, dans un premier temps, de savoir quels sont les différents monomères en présence, avant de déterminer leur enchaînement, c'est pourquoi la méthode de clivage des polysaccharides par l'acide formique a été utilisée.

Traitement solubilisant par l'acide formique

Le traitement des parois par l'acide formique à 90 % les dissout complètement ; il persiste cependant

une trace de flocculum que nous n'avons jamais réussi à isoler. Après évaporation à siccité de l'acide formique, on obtient un résidu dont une partie est soluble dans l'eau, la partie restante est soluble dans le chloroforme ce qui implique une polarité nettement plus faible, par conséquent la présence d'esters.

La formation des esters (dérivés formylés par action de l'acide formique sur les polysaccharides a été déjà signalée par JONES (94) qui préconisait, pour éliminer ces esters, d'effectuer une seconde hydrolyse par l'acide sulfurique ou chlorhydrique dilué.

MONTREUIL et coll. (95) ont étudié les hydrolysats formiques de l'amidon et du maltose et ont signalé que les esters formiques des oses migrent plus rapidement en chromatographie sur papier et réagissent avec le réactif à l'oxalate d'aniline de Partridge.

CROOK et JOHNSTON (50) ont utilisé l'acide formique pour dissoudre les parois des levures Saccharomyces cerevisiae et ont identifié les oses neutres présents dans les solutions formiques après hydrolyses par l'acide sulfurique N.

Les produits de l'hydrolyse formique des parois de Rhodotorula constituent un mélange de fractions de faible poids moléculaire, inclus dans le gel Sephadex G 15. On peut cependant séparer ces fractions par électrophorèse à pH 3,9 (tampon de Michl) (Figure 6).

L'analyse des différentes fractions obtenues après électrophorèse, montre qu'elles sont de composition hétérogène, ainsi, après hydrolyse, la chromatographie révèle la présence en proportions variables d'acides aminés, d'oses et d'hexosamines.

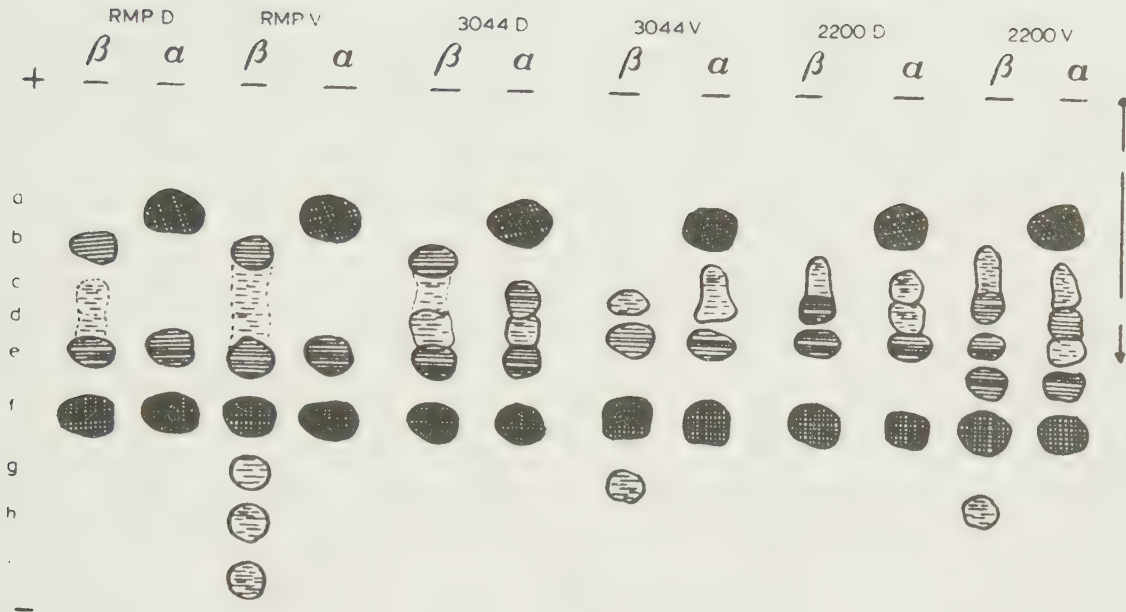


Fig. 6 : Schéma de l'électrophorèse des hydrolysats formiques.

Papier Whatman 3 MM, 2 h 15 V/cm, tampon, pH = 3,9

α : révélation par AgNO_3 , alcalin

β : révélation par le chlore benzidine.

La révélation des électrophorèses et les données rapportées dans le tableau 8, indiquent que les produits d'hydrolyse obtenus ne sont pas seulement des oses et amino-acides libres, mais qu'il s'agit également d'oligopeptides, d'oligosides ou de glycopeptides.

Tableau 8

Teneur en hexoses, hexosamines, glucose et groupements aminés des hydrolysats formiques

Souche	RMP				3044				2200			
	Milieu		D	V	D	V	D	V	D	V	D	V
Pouvoir réducteur	α		2410	2750	2435	2360	2350	2360	2350	2360	2350	2360
	β		3050	3300	3400	3510	3350	3510	3350	3380	3350	3380
Glucose	α		230	127	180	230	117	230	117	178	117	178
	β		320	280	142	235	265	235	265	425	265	425
Group. aminés	α		185	176	27	160	109	160	109	64	109	64
	β		330	240	230	202	210	202	210	220	210	220
Hexosamines	α		89	77	30	255	67	255	67	77	67	77
	β		135	220	138	515	190	515	190	195	190	195

Résultats exprimés en nM:mg de parois lyophilisées : moyenne de 3 expérimentations :

α : solution formique

β : solution formique traitée par HCl 2 M pendant 2 h à 105° C

β' : solution formique traitée par HCl 6 M pendant 12 h à 105° C

Ces résultats montrent des variations identiques à celles observées par examen direct des parois mais avec des teneurs globales plus faibles (tableau 8), à savoir que les parois provenant du milieu D sont plus riches en aminoacides que les parois du milieu V, tandis que pour la teneur globale en hexosamines, ce sont les parois du milieu V qui en sont les plus riches. Notons aussi que la teneur globale en hexoses est quasi constante dans toutes les parois des différentes souches étudiées.

Après hydrolyse chlorhydrique des solutions formiques, la chromatographie sur papier révèle la présence de galactose, glucose, mannose et de fucose. Le tableau 9 nous donne les différents rapports molaires de ces oses estimés selon la technique de WILSON (63).

Tableau 9

Rapports molaires des oses neutres dans les parois des trois souches de levures Rhodotorula

Souche	RMP		3044		2200	
Milieu de culture	D	V	D	V	D	V
Galactose	0,7	0,6	0,5	0,4	0,4	0,3
Glucose	0,4	0,4	0,3	0,3	0,4	0,5
Mannose	1	1	1	1	1	1
Fucose	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,05

- Résultats de la chromatographie quantitative sur papier selon la technique de Wilson.

- Moyenne de 4 expérimentations.

En ce qui concerne la recherche et la détermination des aminoacides, elles ont été réalisées après hydrolyse chlorhydrique 5,6 M pendant 18 h. Les résultats de la composition et les rapports molaires des différents aminoacides sont rassemblés dans le tableau 10.

On remarque la très faible teneur en aminoacides soufrés et l'absence d'une répartition prédominante d'un aminoacide ou d'un groupement d'aminoacides. De plus, les parois provenant du milieu D ont une teneur nettement supérieure en aminoacides que celles issues du milieu V. Cette différence est très marquée pour la souche Rh. glutinis 3044. Or, comme nous l'avons signalé ci-dessus une telle différence dans la teneur en protéine peut être observée chez d'autres levures, telle Saccharomyces cerevisiae lorsqu'elle est cultivée dans un milieu nutritif déficitaire en inositol (travaux de POWER) : dans ce cas, les parois ont une teneur globale en aminoacides plus faible, mais il apparaît alors une prédominance des dérivés dicarboxyliques (glu. et asp.).

Enfin, dans toutes les préparations des parois que nous avons étudiées, nous n'avons pu identifier la présence d'acide gamma aminobutyrique signalée par CROOK et JOHNSTON dans les parois d'une souche de Rhodotorula aurantiaca.

II - NATURE DES HEXOSAMINES

La chromatographie sur papier d'hydrolysats chlorhydriques contenant des hexosamines ne permet pas de différencier correctement la glucosamine, la galactosamine et mannosamine. Pour cela il est préférable d'avoir recours à l'électrophorèse et à la chromatographie en phase gazeuse

L'électrophorèse effectuée sur papier Whatman 3 MM à pH 9,2 (tétraborate de sodium 23,4 g soude 1N, 30 ml eau Q.s.p 1.000 ml) selon la procédé de FOSTER et coll

Rapports molaires des aminoacides dans les parois des souches RMP, 3044, 2200 après culture sur milieux D et V.

Souche	RMP		3044		2200	
Milieu	D	V	D	V	D	V
Ac. aspartique	5,5	2,6	6	0,9	1	1,3
Thréonine	2,3	1,5	3	0	0,8	0,8
Sérine	4	2,7	7	1,8	1,2	2
Ac. glutamique	4,5	2,7	5	1,5	1	1,6
Glycine	6,4	3,3	9	4	3	2,9
Alanine	5,4	3,5	7,3	1,2	1,6	2
Valine	2	1,2	2	0	0	0,7
Cystine	traces	traces	traces	traces	traces	traces
Méthionine	traces	traces	traces	traces	traces	traces
Isoleucine	1	0,7	1,2	0	0,6	0,5
Leucine	2,5	3,3	3	1	1,1	0,6
Tyrosine	1,1	0,7	2,5	0	0,6	0,3
Phénylalanine	0,7	1	2	0	0,6	0,4
Lysine	1	1,3	1	1,2	1	1,2
Histidine	0,7	0,8	1	1,1	0,5	0,4
Arginine	1,1	1,2	1	0	0	0,5

- Valeurs estimées après hydrolyse chlorhydrique d'une prise d'essai de 5 mg d'hydrolysats formique à l'autoanalyseur Technicon.
- Résultats exprimés par rapport à la teneur en lysine, dans les parois de chaque souche après culture sur milieu D.

(69) permet de séparer la N-acétylglucosamine, la N-acétylgalactosamine et la N-acétylmannosamine. En opérant sur les quantités de produits dont nous disposions, nous n'avons pas réussi à mettre en évidence plusieurs hexosamines, seule la N-acétylglucosamine dont la concentration est relativement élevée, a pu être identifiée.

Nous avons tenté de rechercher la nature des hexosamines par chromatographie en phase gazeuse, méthode plus sensible. L'hydrolysât chlorhydrique est purifié par passage sur résine échangeuse de cations Dowex 50 x 8. L'élution par l'acide chlorhydrique 0,4 N permet d'éluer des osamines et une partie des aminoacides avec un rendement de 30 % par rapport au matériel de départ. L'éluat séché est acétylé sur la fonction amine puis soumis à la méthylglycosilation. L'analyse chromatographique est effectuée après trifluoroacétylation selon la technique de ZANETTA (65).

L'interprétation des diagrammes n'est pas immédiate en raison de la multiplicité des pics entraînés par la présence des aminoacides. Cependant dans chaque cas, nous observons un pic de rétention identique à celui de la N-acétylglucosamine témoin. Son identification a été corroborée par chromatographie sur colonne échangeuse de cations (Chromobeads C2) suivie d'un dosage d'osamines à l'autoanalyseur Technicon selon le mode opératoire préconisé par MONSIGNY (96). L'ensemble de ces résultats tend à prouver que seule la glucosamine est en quantité appréciable dans les parois de levure Rhodotorula.

L'examen de la composition chimique des parois fait ressortir que la diminution de la teneur en azote total est consécutive à la baisse des aminoacides, l'augmentation même importante, parfois, de la teneur en hexosamines ne contrebalance pas cette baisse.

Les cultures réalisées soit sur le milieu V, soit sur le milieu D ne conduisent pas à l'obtention de parois présentant une différence notable dans la composition qualitative des aminoacides ; on observe seulement une diminution globale des aminoacides dans les parois des cellules cultivées sur milieu V. Il existe cependant, comme le font apparaître nos études, des cinétiques d'hydrolyse acide des différences dans la résistance des parois à l'acide chlorhydrique. Ainsi, les parois qui sont issues de levures cultivées en milieu D ne donnent une libération maximale d'aminoacides qu'après 15 heures d'hydrolyse, alors que celles provenant de cultures en milieu V donnent ce résultat après 5 heures seulement. Quant à la libération des hexosamines, on assiste au phénomène inverse. Ce sont les parois du milieu V, c'est-à-dire les plus riches en hexosamines, qui libèrent plus tardivement ce composé, le maximum d'hydrolyse est en effet atteint après 5 heures d'hydrolyse tandis que pour les parois du milieu D le maximum est atteint après 2 heures. La plus grande quantité d'hexosamines dans les parois V est probablement impliquée dans des liaisons plus solides, ce qui rend leur libération, sous forme de monomère, moins facile, donc allonge le temps d'hydrolyse.

Ce phénomène peut s'expliquer par une compensation adaptative, entre les levures se développant en milieu D et en milieu V, qui se traduit par un échange dans la stabilité respective de deux types de polymères, l'un à base de glucosamine, l'autre plus riche en protéines. En effet, les parois dont la glucosamine est particulièrement résistante à l'hydrolyse acide sont peut être dotées d'un type polymérique dérivé de la chitine plus stable, plus rigide et par compensation les protéines de liaison sont plus faibles.

Enfin, lorsqu'on examine la composition glucidique des parois, celle-ci apparaît assez complexe dans les parois de levures Rhodotorula. En effet, chez Saccharomyces cerevisiae, on ne retrouve que du glucose et du mannose avec une prédominance de glucose. De même, dans les parois de Candida albicans, CHATTAWAY et coll. (4) n'ont signalé la présence que de glucose et de mannose dans un rapport molaire de 3/1, dans cet exemple encore le glucose est le composant glucidique majoritaire.

Dans les trois souches de Rhodotorula que nous avons étudiées, nous constatons la présence de deux oses supplémentaires, le galactose et le fucose ce qui fait au total 4 oses neutres et une hexosamine. La présence de ces 5 sucres avait déjà été signalée pour une souche de Rhodotorula aurantiaca (50). La nette prédominance de mannose parmi ces sucres constitue une différence supplémentaire entre ces levures Rhodotorula et celles des genres Saccharomyces et Candida les mieux étudiées. Cette variété plus grande d'oses neutres laisse envisager vraisemblablement des structures polysaccharidiques, non seulement différentes, mais aussi plus complexes que celles décrites jusqu'à présent dans les parois.

CHAPITRE III

FRACTIONNEMENT DES PAROIS

I - Traitement des parois par l'éthylène diamine

Nous avons vu dans le chapitre précédent que le traitement des parois par l'acide formique à 90 %, selon le procédé de CROOK et JOHNSTON (50) permet d'accéder à la détermination des divers éléments monomériques constitutifs de la paroi ; mais leur enchaînement et la structure globale des polymères doivent être abordés par des méthodes spécifiques. Dans le but de recueillir des macromolécules solubles, on procède à un traitement doux, respectant certaines liaisons. Ainsi, les auteurs utilisent habituellement les alcalis pour isoler des polysaccharides des parois des levures. Or, selon KORN et coll. (40), ces traitements alcalins effectués au bain-marie bouillant ou à 80° C entraînent inévitablement un clivage des complexes protéines-glucides, surtout quand il s'agit de liaisons vulnérables aux bases. Aussi, ces auteurs ont-ils utilisé pour fractionner les parois de levure du genre Saccharomyces cerevisiae un traitement par l'éthylène diamine. Ils obtiennent de cette manière trois fractions A, B, C qui représentent respectivement 35 %, 11 % et 47 % de la masse des parois lyophilisées. Les trois fractions A, B et C semblent être de nature glycoprotéinique et contiennent toutes, dans des proportions variables, de la glucosamine.

La fraction A est constituée des produits solubles dans l'eau distillée et dans l'éthylène diamine. La fraction B renferme des produits insolubles dans l'eau, mais solubles dans l'éthylène diamine, la fraction C, de nature particulière est insoluble dans l'éthylène diamine. SENTADREU et coll. (41) puis POWER et coll. (92) ont également appliqué cette technique de fractionnement sur les parois de

Sacch. cerevisiae. Par ce procédé, SENTADREU a pu isoler des composés de nature glycoprotéinique hydrosolubles dans lesquels il a déterminé la présence d'une liaison O-glycosidique entre la copule protéique et la copule glucidique (42). Quant aux résultats obtenus par POWER et coll. qui ont analysé l'influence de milieu déficient en inositol sur la composition chimique des parois de Sacch. cerevisiae, ils révèlent des variations quantitatives importantes dans la composition respective des fractions A, B et C selon qu'elles proviennent de milieux normaux ou de milieux déficitaires. Les compositions chimiques des trois fractions A, B et C ne sont pas homogènes mais de façon générale, c'est la fraction C qui est la plus riche en hexosamines.

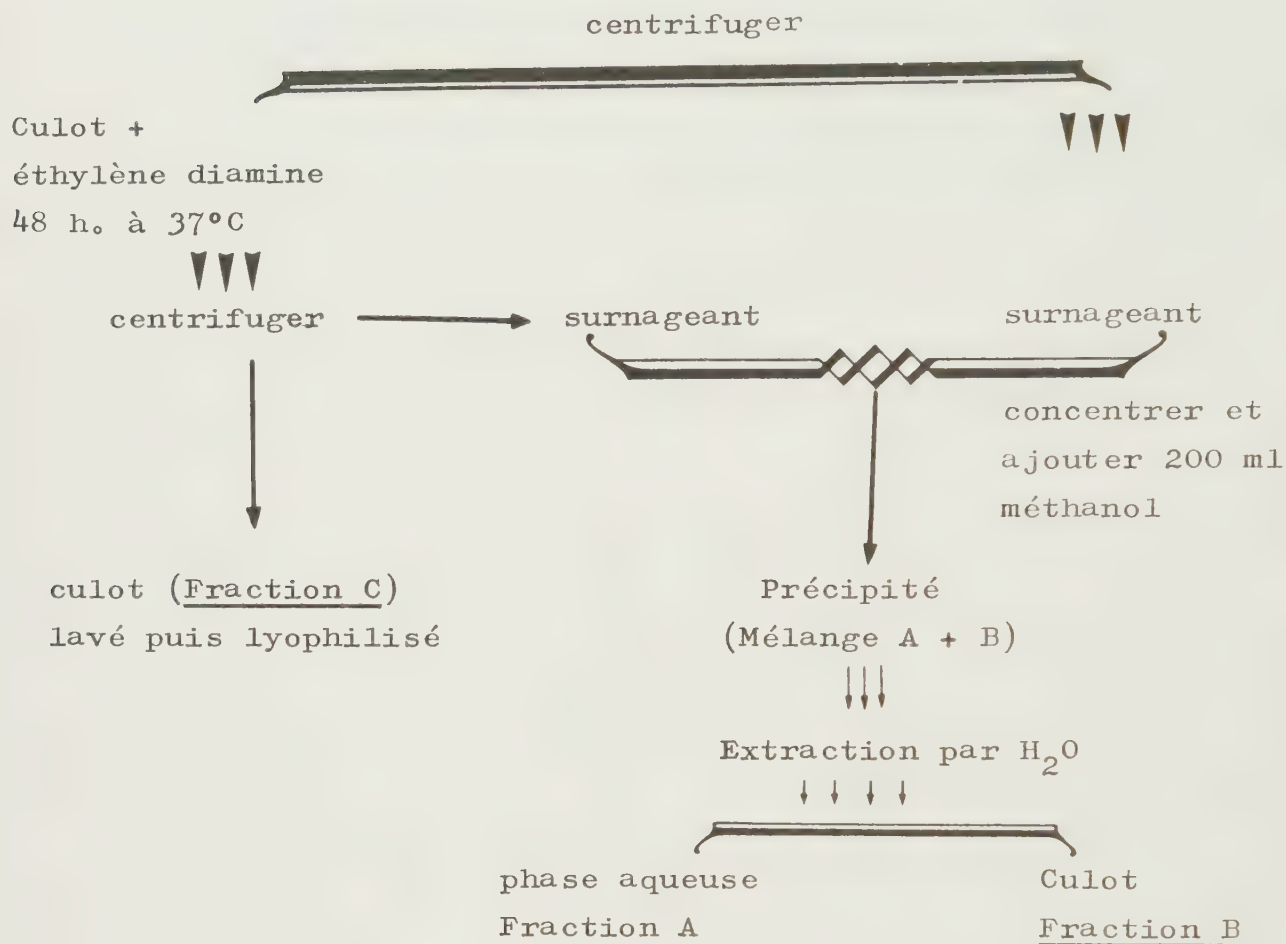
L'éthylène diamine offre sans doute un clivage plus spécifique des polymères sans altérer les liaisons labiles à l'alcalin entre la copule glucidique et la copule protéique. Nous avons appliqué cette méthode de fractionnement aux parois des levures du genre Rhodotorula. Pour cela un gramme de parois lyophilisées et conservées sous P_2O_5 est mis en suspension dans 125 ml d'éthylène diamine fraîchement distillée. Les parois sont bien dispersées dans l'éthylène diamine et placées à l'étuve à 37° C, avec agitation intermittente. Après 24 h. de contact, le mélange est centrifugé. Le surnageant est conservé, le culot est remis en suspension dans l'éthylène diamine et placé à nouveau à l'étuve à 37° C pendant 48 h. Après quoi le mélange est centrifugé. Le culot, qui représente la fraction C, est lavé deux fois avec de l'éthylène diamine, deux fois avec de l'éther sulfurique et du méthanol puis lavé jusqu'à neutralité avec de l'eau distillée.

Toutes les solutions dérivant de l'action de l'éthylène diamine sont rassemblées et évaporées sous pression réduite jusqu'à obtention d'une solution visqueuse ayant un volume final de 5 ml environ. On procède ensuite à l'addition de 200 ml de méthanol et on abandonne le mélange pendant 18 h. à + 4° C. Le précipité formé est recueilli

par centrifugation. Ce précipité est constitué par le mélange des fractions B et A qui seront séparées grâce à leur différence de solubilité dans l'eau distillée. En effet, la fraction A sera extraite du mélange par agitation énergique pendant une heure avec des quantités appropriées d'eau distillée. La phase soluble constitue la fraction A, le résidu en général blanchâtre, constitue la fraction B. Après séparation, chaque fraction est lyophilisée.

Schéma du fractionnement des parois par l'éthylène diamine

1 g de parois de levure + 125 ml d'éthylène diamine
24 heures, 37° C



-L'éthylène diamine utilisée doit être fraîchement distillée pour éliminer la présence de composés colorés.

-Chaque incubation se fait à l'étuve à 37° C en flacons bouchés.

A) - Taux des fractions A, B, C dans les parois de levure Rhodotorula

Nous retrouvons pour les parois des Rhodotorula, les trois fractions A, B, C déjà isolées lors du traitement des parois d'autres levures (97). Les masses pondérales recueillies pour chaque fraction varient suivant les souches. Nous avons rapporté dans le tableau 11, les différents pourcentages. Ces résultats font apparaître que ce sont les parois de la souche Rh. rubra RMP qui sont les plus clivées par cette méthode. En effet, les pourcentages des fractions C sont nettement inférieurs à ceux retrouvés pour les souches Rh. glutinis 2200 et Rh. aurantiaca 3044. Ceci révèle que les liaisons et les éléments constituant l'architecture et la paroi des 3 levures sont différents.

Tableau 11

Pourcentage des différentes fractions A, B, C après traitement par l'éthylène diamine.

Souche	RMP			3044			2200		
Milieu	D	⋮	V	D	⋮	V	D	⋮	V
Fraction A	10	⋮	9	9	⋮	3,9	7,4	⋮	4,8
Fraction B	37	⋮	14,5	2	⋮	2,3	14	⋮	6,3
Fraction C	51	⋮	59	78	⋮	80,5	76	⋮	86
Total	98	⋮	82,5	89	⋮	86,7	97,4	⋮	97,1

Les résultats sont les moyennes de deux expériences sur deux lots différents de parois.

Pour les parois de Sacch. cerevisiae, KORN et NORTHCOTE ont obtenu à partir d'une souche commercialisée 15 % de Fraction A, 11% de B et 47 % de C, POWER et coll. ont obtenu pour une souche cultivée dans des conditions de laboratoire des pourcentages sensiblement différents soit

23,7 %, 10,4 % et 59,9 % respectivement pour A, B, C. (92).

Les fractions A, B et C obtenues à partir des parois des levures Rhodotorula sont en proportions très différentes par rapport à celles de Sacch. cerevisiae. Cette différence peut signifier, en admettant que le mode d'action de l'éthylène diamine reste constant sur les parois des levures (ce qui est hautement probable puisque le fractionnement est reproductibles sur chaque lot de parois), une disposition des constituants pariétaux totalement différente entre les levures Rhodotorula et Saccharomyces.

Nous avons rapporté dans le chapitre précédent que la composition chimique des parois de levure du genre Rhodotorula est plus complexe que celle de Saccharomyces. Il est donc fort probable que la structure le soit également, ne serait-ce que par la présence d'éléments monomères nouveaux impliqués dans de nouvelles liaisons.

B) - Composition chimique des fractions A, B, C

Les trois fractions A, B, C de toutes les parois renferment des hexoses, des hexosamines et des amino-acides. La teneur en hexosamines varie d'une fraction à l'autre suivant la souche et le milieu de culture.

Dans le tableau 12, nous avons rassemblé les teneurs en hexosamines des différentes fractions. La comparaison avec les données bibliographiques indique que les teneurs en hexosamines sont supérieures à celles observées chez Sacc. cerevisiae (25) (40), mais c'est surtout dans la fraction C que cette augmentation est la plus caractéristique. Il est établi que la chitine, polymère de N-acétyl-glucosamine est inerte à l'action de l'éthylène diamine, il apparaît donc que l'importante proportion d'hexosamines trouvés dans ce produit C devrait provenir, en grande partie, de cet amino-polysaccharide.

Tableau 12

Teneur en hexosamine dans les fractions A, B, C des levures RMP, 3044 et 2200 cultivées sur milieux D et V.

Souche	RMP		3044		2200	
Milieu	D	V	D	V	D	V
A	52	28	150	36	52	63
B	17	20	52,5	400	19	30
C	471	462	340	840	481	526

- Résultats exprimés en glucosamine nmoles/mg après hydrolyse chlorhydrique 6 N, 6 heures.

- Moyenne de deux expérimentations.

La présence d'acides aminés dans chaque fraction nous a conduit à en effectuer une analyse détaillée afin de déterminer leur répartition. Dans le tableau 13 nous donnons les résultats se rapportant aux fractions A, B et C des parois de la souche RMP après culture dans les milieux D et V. Nous retrouvons dans toutes les fractions la gamme des acides aminés déjà cités pour les parois de ces levures, avec la même différence en teneur globale suivant que les levures sont cultivées sur milieu D ou V. Une constatation importante doit cependant être signalée. Les différentes fractions n'ont pas une teneur totale identique en acides aminés. Ce sont les fractions C qui présentent le pourcentage le plus faible et ce sont les fractions A qui en sont les plus riches. Ce qui conduit à penser que l'éthylène diamine attaque de préférence certaines liaisons reliant soit des peptides entre eux, soit des peptides et des glycanes à l'exclusion de liaisons glycosidiques et N-glycosidiques apparemment stables dans l'éthylène diamine.

Souche: Fraction:	RMP (milieu D)			RMP (milieu V)		
	A		B		C	
	Concn.	Rapport	Concn.	Rapport	Concn.	Rapport
Acide aspartique	220	8.80	27.5	2.30	14.5	1.30
Thréonine	116	4.60	20	1.66	12	1.10
Sérine	128	5.10	20	1.66	12.6	1.10
Acide glutamique	94	3.70	18	1.50	18.5	1.60
Proline	60	2.40	17	1.40	9.8	0.88
Glycine	180	7.20	27.5	2.30	21.5	1.90
Alanine	170	6.80	26.7	2.20	16.8	1.50
Valine*	22	0.88	20	1.66	14	1.25
1/2 Cystine*	?	—	?	—	?	—
Méthionine*	16	0.66	10	0.83	21	1.87
Isoleucine	40	1.60	12.4	1.02	11	1
Leucine	72	2.90	19	1.54	12.8	1.10
Tyrosine	39	1.50	12	1	9.8	0.88
Phénylalanine	60	2.40	12	1	11.2	1
Lysine	25	1	12	1	11.2	1
Histidine	24	1	15	1.25	12.3	1.10
Arginine	34	1.35	14	1.23	10.3	0.92
Total	1320	—	283.1	—	219.3	—
				218.9	186.6	171.6

Concentration et rapports molaires des aminoacides dans les fractions A, B et C des levures RMP après culture sur milieu D et V

- Teneurs exprimées en umoles/mg.

- Rapports molaires calculés par rapport à la lysine.

- ?, traces non dosables.

Toutes les fractions A, B, C ont également, à côté des hexosamines, des oses neutres. Les différentes fractions A, solubles dans l'eau, contiennent lorsque les levures sont cultivées dans le milieu D, du mannose, du glucose et du galactose, et lorsque les levures sont cultivées dans le milieu V, ces fractions contiennent du mannose et du glucose.

Les fractions B sont constituées principalement de glucose et de mannose. Quant aux fractions C, elles renferment les quatre oses neutres déjà signalés : glucose, galactose, mannose et fucose avec une prédominance nette du mannose.

C) - Etude morphologique des fractions C

Les fractions C sont constituées par des éléments particuliers. L'examen au microscope à contraste de phase de ces éléments (ou fractions C) révèle qu'ils présentent encore une structure très proche de celle des parois. L'étude au microscope électronique nous a permis de confirmer ces données. Le traitement par l'éthylène diamine, d'une manière générale ne semble pas avoir altéré la structure fondamentale de la charpente, un aspect fibrillaire est toujours discernable.

Dans le tableau 14 sont réunis les résultats des mesures des épaisseurs des fractions C et ceux des parois correspondantes. La comparaison des valeurs atteste que le traitement par l'éthylène diamine entraîne une diminution systématique de l'épaisseur des parois, cette diminution est parallèle à la perte en poids.

Tableau 14

Variations des épaisseurs des parois et des fractions C
des souches Rh. rubra RMP, Rh. glutinis 3044, Rh. AURANTIACA 2200

Souche	Milieu	Epaisseur de la paroi	Epaisseur des fractions C	Perte d'épaisseur en %	Perte de Poids
RMP	D	1070	500	53	49
RMP	V	1160	500	57	41
3044	D	530	450	15	22
3044	V	880	650	26	19
2200	D	1170	800	32	24
2200	V	1110	950	15	14

- Epaisseur exprimée en Å (résultats moyens de 20 mesures)
- Perte d'épaisseur : diminution de l'épaisseur des parois
après traitement par l'éthylène diamine.
- Perte de poids : diminution de la masse des parois
après traitements par l'éthylène diamine

Il est cependant à noter que ces mesures sont données uniquement à titre indicatif, car contrairement aux parois correspondantes, la détermination exacte des épaisseurs des fractions C, se révèle très difficile.

Dans de nombreux cas, il est en effet impossible de définir les limites exactes de ces fractions, ce qui est vraisemblablement dû à une désagrégation des surfaces ou à une compression des surfaces internes lors des centrifugations successives nécessaires à l'isolement de ces fractions C.

Pour les parois de la souche Rh. rubra RMP, la diminution de l'épaisseur est de l'ordre de 50 %. Du point de vue morphologique, on note dans le cas des parois issues du milieu D (planche III) la disparition quasi complète de la gaine mucilagineuse. Quant aux fractions C des parois issues du milieu V (planche IV - cliché 16), la diminution de l'épaisseur peut être due à une sorte de "dislocation" de la structure. Les parois de la souche Rh. rubra RMP provenant du milieu V (planche I) n'ont pas un aspect homogène : on peut observer des zones qui présentent une structure différente de celles du reste de la paroi. C'est la solubilisation de ces zones qui fournit aux fractions C un aspect déchiqueté, voire érodé en surface, et un écrasement apparemment anarchique (dislocation des fibrilles).

Pour les parois de la souche 3044, après culture en milieu D, on note une perte d'épaisseur de 15 % environ, avec la disparition d'une bordure diffuse mucilagineuse (planche V - cliché 20), tandis qu'après culture en milieu V, les parois perdent 20 % de leur épaisseur, ce qui correspond à une large dislocation, probablement due à la disparition des zones claires dans les parois de cette souche (cliché 22).

Quant aux parois de la souche 2200, les fractions C recueillis après traitement par l'éthylène diamine ne présentent plus l'aspect général des parois. Dans les fractions C (planche VI) venant des parois issues du milieu D, la gaine a disparu et il est très difficile de reconnaître l'aspect des enveloppes cellulaires. La charpente fondamentale est conservée, mais les cavités initialement présentes ont disparu ou leur taille a considérablement diminué. Dans les fractions C issus du milieu V, les cavités existant déjà dans les parois correspondantes (planche III) restent bien visibles (planche VI - cliché 26). La nature et l'origine de ces cavités n'ont pu être définies.

Les analyses chimiques et l'examen morphologique font donc ressortir que le traitement par l'éthylène diamine n'altère pas ou peu la structure fibrillaire responsable semble-t-il de la forme des parois. Ce traitement occasionne des modifications secondaires surtout au niveau de la gaine mucilagineuse. Les produits solubilisés peuvent être soit des substances incrustant la charpente fondamentale fibrillaire, soit les substances de la gaine. La grande quantité d'acides aminés éliminés ne semble donc pas mettre en cause l'architecture fondamentale de la paroi.

PLANCHE IV

Fractions C des parois de levure Rhodotorula
rubra après traitement par l'éthylène diamine

Clichés 14 - 15 : Fractions provenant de cellules culti-
vées dans milieu D

Clichés 16 - 17 : Fractions provenant de cellules culti-
vées dans milieu V.

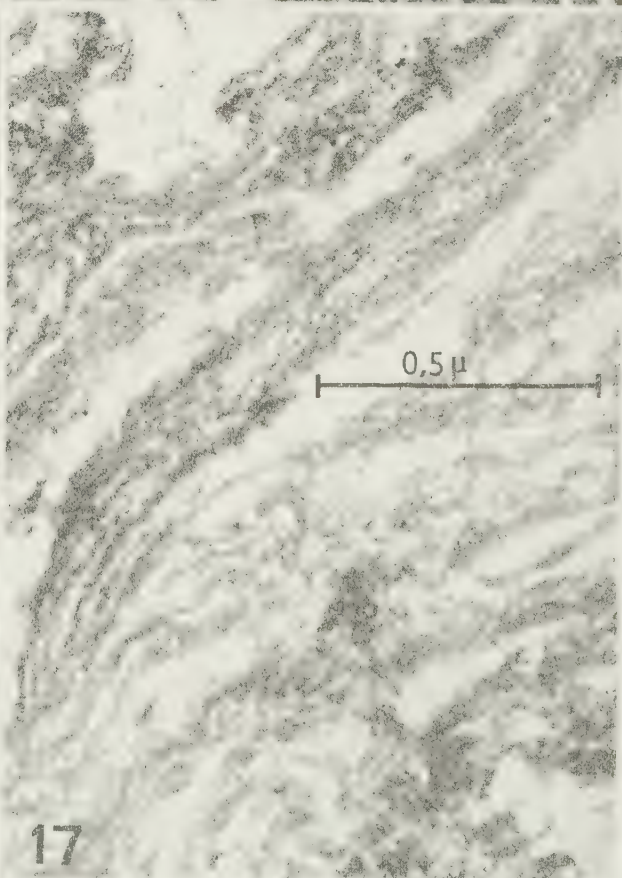
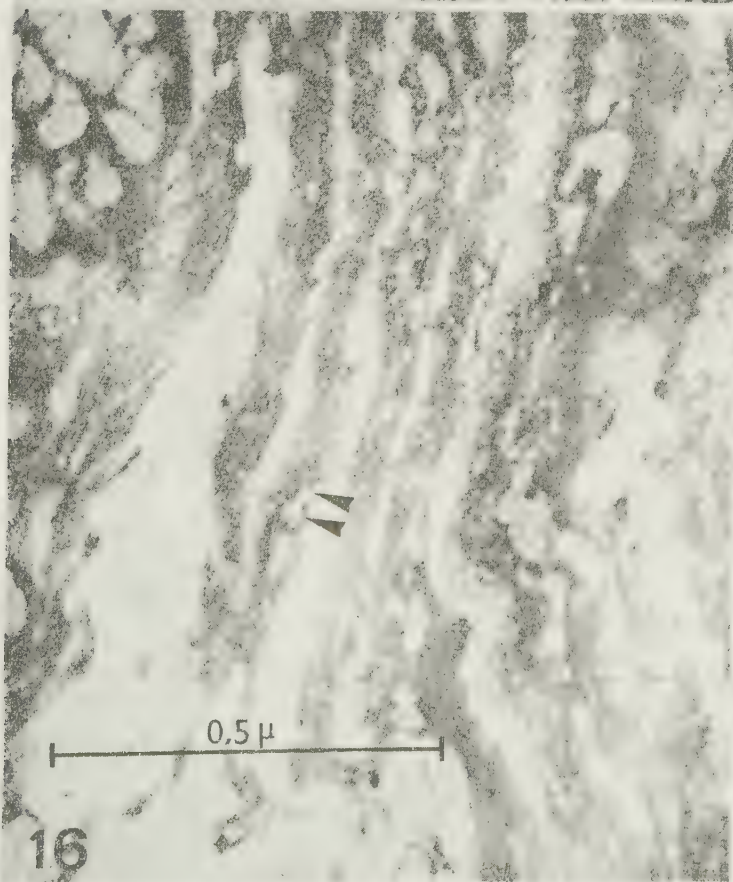
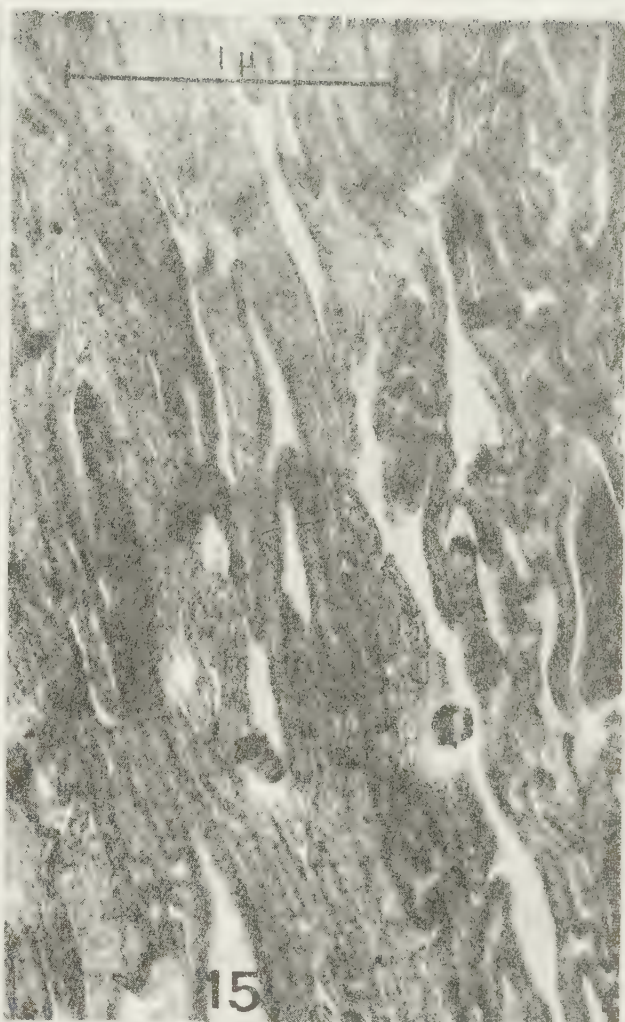
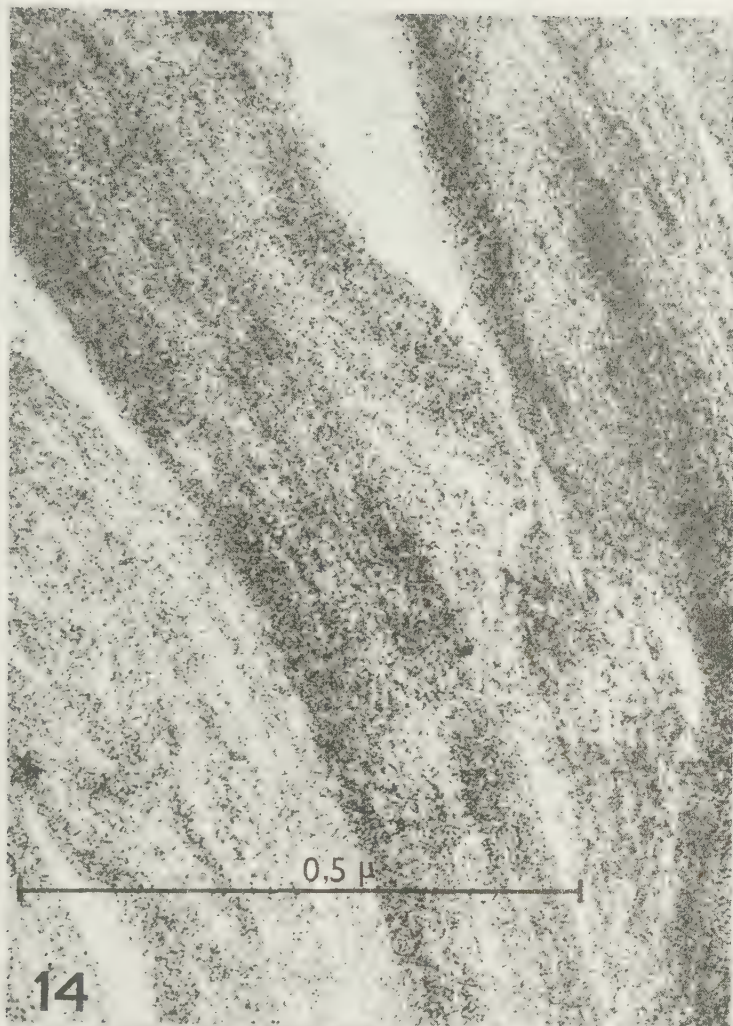


PLANCHE VI

Fractions C des parois de levure Rhodotorula
glutinis 3044.

Clichés 18 - 19 - 20 : Fractions provenant de parois
issues du milieu D

Cliché 20 : Les flèches indiquent la dispa-
rition de la bordure diffuse

Clichés 21 - 22 : Fractions provenant de parois
issues du milieu V

Cliché 22 : Les flèches indiquent la dispa-
rition des zones clairs.

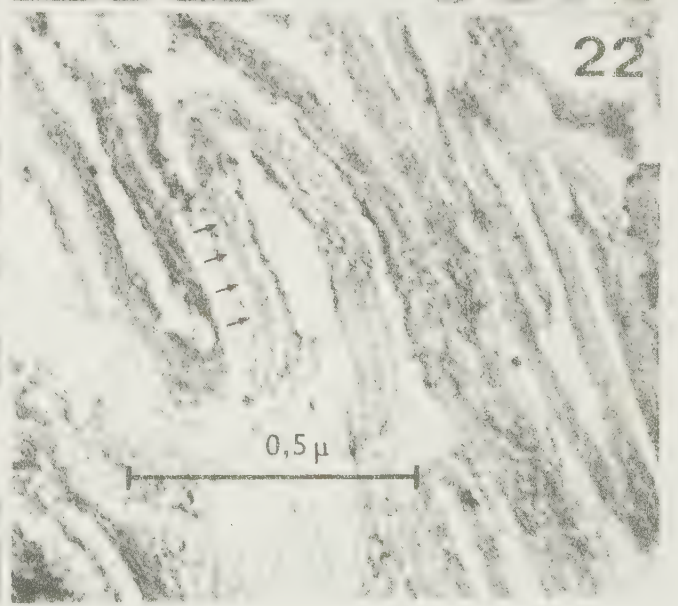
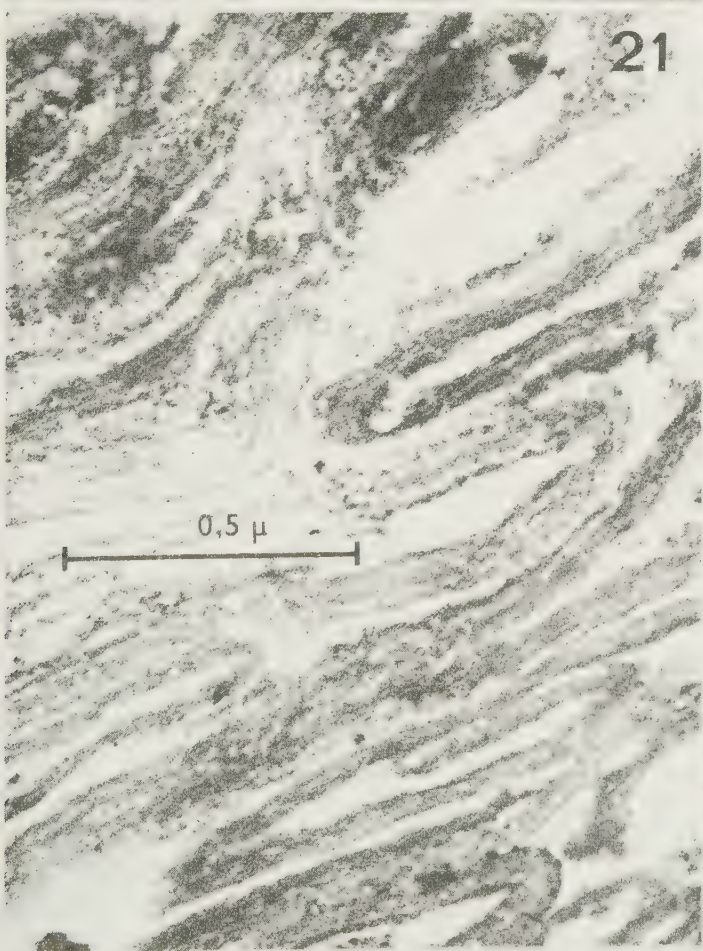
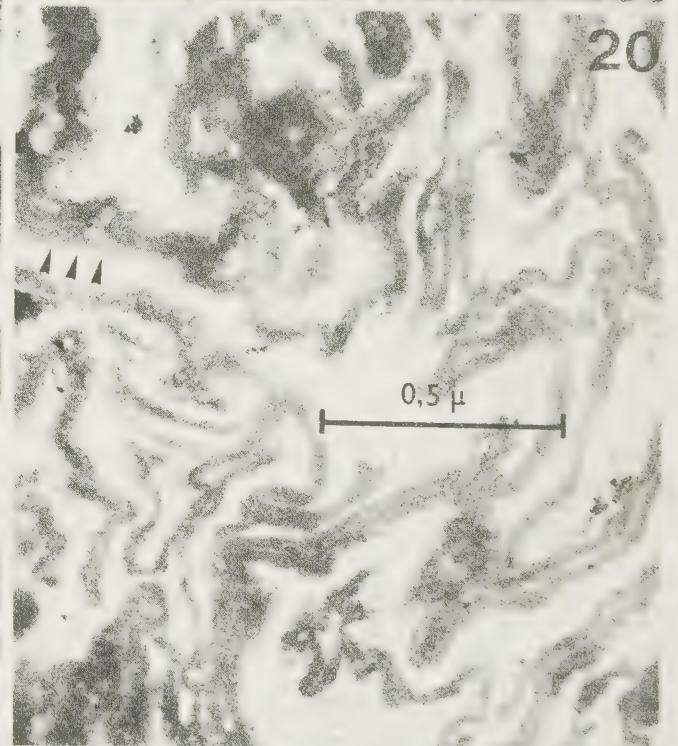
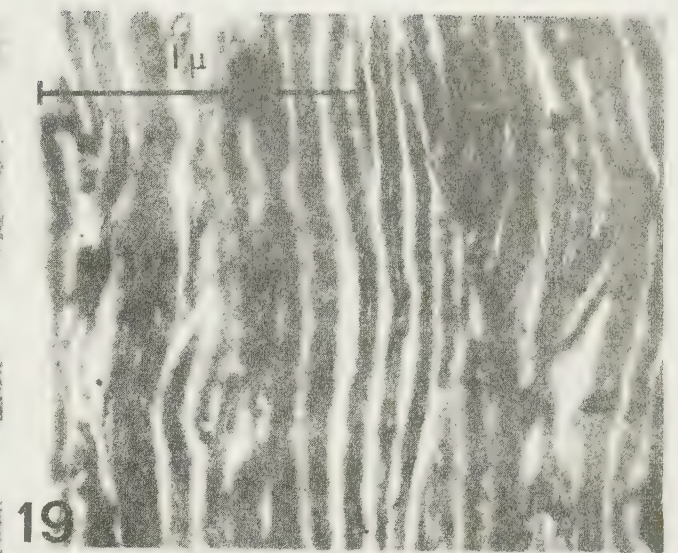
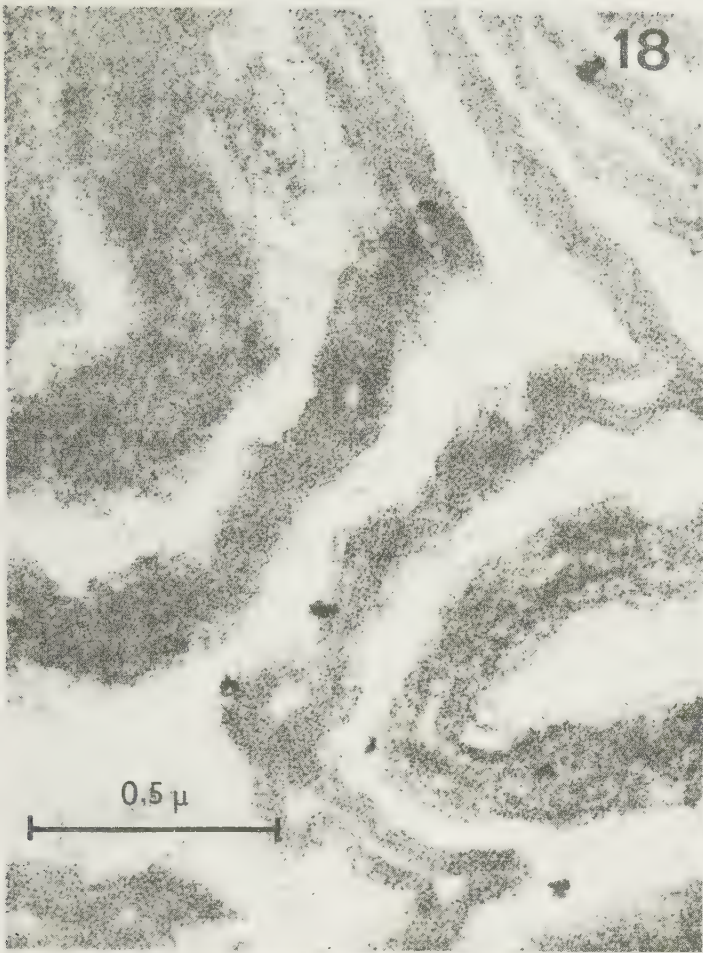
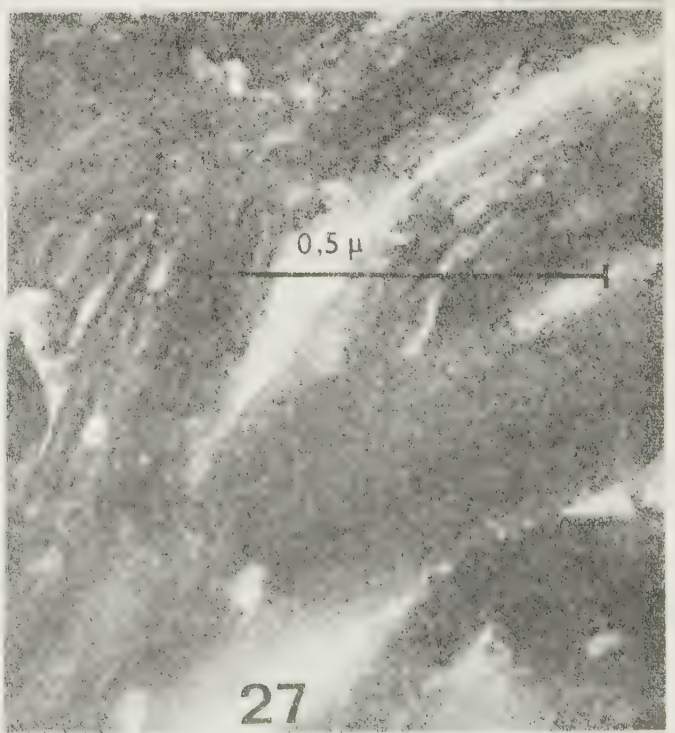
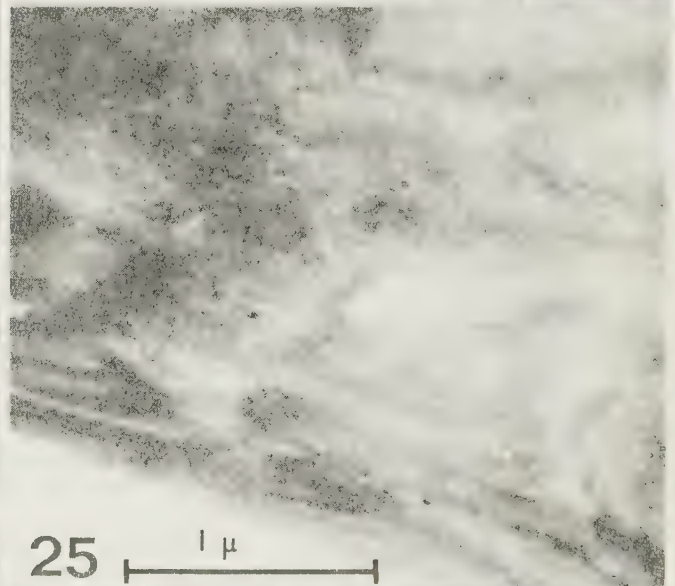
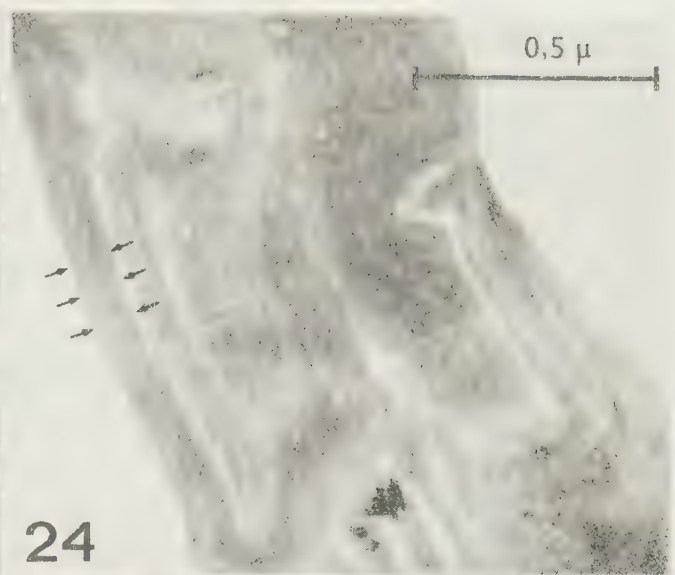
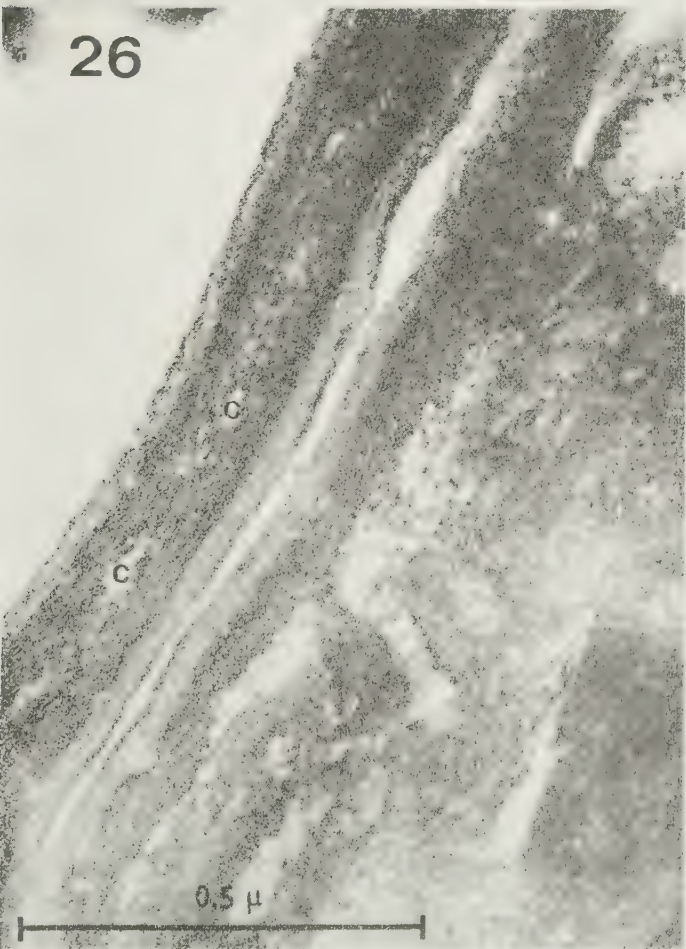
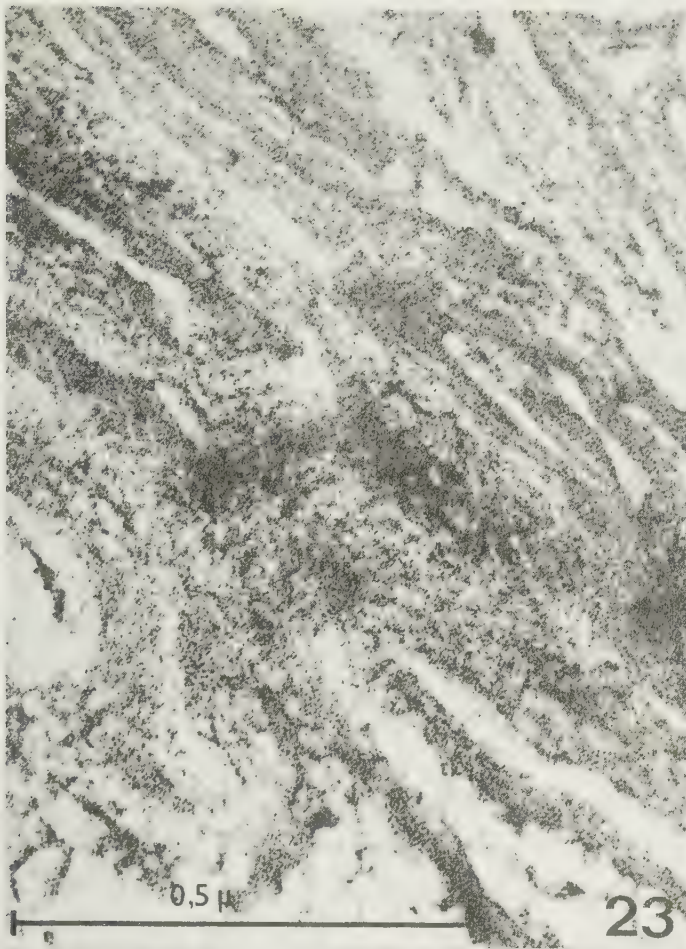


PLANCHE VI

Fraction C des parois de levure Rhodotorula
Aurantiaca après traitement par l'éthylène diamine

Clichés 23 - 24 - 25 : Fractions C provenant des parois
issues du milieu D

Clichés 26 - 27 : Fractions C provenant des parois
issues du milieu V.



CHAPITRE IV

ETUDE DE LA CHITINE

La richesse relative des parois de levures Rhodotorula (Chapitre II) en glucosamine, nous a conduit à l'hypothèse qu'elles étaient peut être constituées en partie de chitine.

La chitine est assez répandue parmi les invertébrés, les champignons ou les levures. Son étude se révèle difficile par suite de son insolubilité et de sa résistance marquée aux hydrolyses chimiques et enzymatiques, surtout lorsqu'elle se trouve intimement liée à d'autres produits. Pour son étude chez les microorganismes, des méthodes physiques, chimiques et biologiques ont été appliquées (98).

L'identification de la chitine dans les parois des levures date des travaux de SCHMIDT (99) qui réussit en 1936 à mettre en évidence la glucosamine et la chitosanne (chitine partiellement désacétylée) chez certaines levures filamenteuses. A la suite des travaux de ROELOFSEN et HOETTE (36) la chitine devait être caractérisée dans presque toutes les levures à l'exception des Schizosaccharomyces. Des études ultérieures basées sur l'examen aux rayons X confirment la présence de la chitine dans les parois de levures, sans pour autant en déterminer sa structure physico-chimique.

De plus, sa localisation et sa quantité, restent discutées, en effet, pour KORN et NORTHCOTE (40), 9 % seulement de la glucosamine des parois de S. cerevesiae possèdent les propriétés d'insolubilité de la "chitine type". BACON et coll (100) en 1966 ont développé une technique de fractionnement des parois des levures Saccharomyces en les

traitant par un tampon acétate pH 5 à 75°C pendant 3 heures ; le résidu qu'ils ont obtenu après ce traitement contient 50 % de chitine. Par ailleurs, il est bien admis que les cicatrices de bourgeonnement sont riches en chitine (101) ; les résultats de BACON et coll. tendant ainsi à montrer que seulement 20 % de la chitine totale des parois de Saccharomyces sont localisés dans les cicatrices de bourgeonnement et résistent aux différents traitements acides ou alcalins. Aussi, ces auteurs émettent-ils l'hypothèse qu'il peut exister deux types de chitine dans les parois, l'une de caractère propre à la "chitine type" rencontrée au niveau des cicatrices de bourgeonnement (102), l'autre quantitativement plus importante, constituant un élément structural à base de N-acétyl-glucosamine.

Les travaux de HOUWINK et KREGER (58) par ailleurs montrent que la chitine peut être répartie dans toute la paroi. Selon BERAN et coll. (103) elle peut jouer un rôle stabilisateur du glycanne.

La chitine est un homoglycane de structure linéaire (104). Ce sont MEYER et MARK (105) qui ont proposé pour ce composé une structure identique à celle de la cellulose, mais avec la différence que le carbone 2 est substitué par un groupe amine acétylé à la place de l'hydroxyle secondaire. Ainsi la chitine doit être considérée comme un polymère de β -N acétyl-D-glucosamine ou 2 acétamido-2-deoxy-D-glucose avec des liaisons β 1 $\longrightarrow$ 4 glycosidiques. Cette structure a été ultérieurement confirmée par BERGMAN qui réussit à isoler le chitobiose (105).

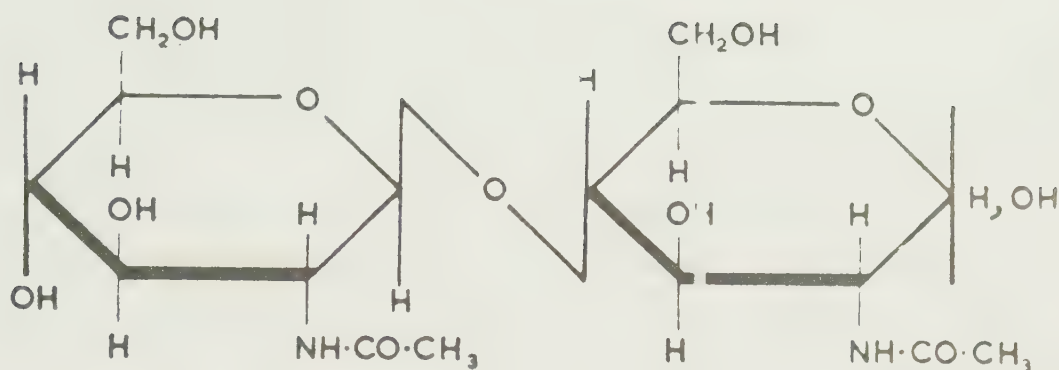


Fig. 7 : Chitobiose.

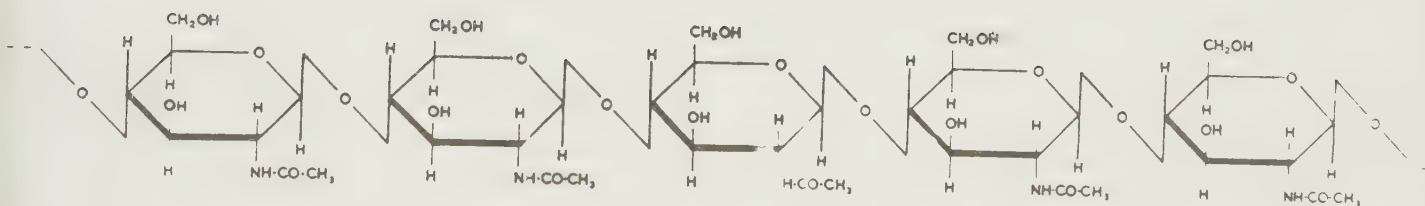


Fig. 8 : Chitine.

La chitine (Fig. 8) étant un polymère régulier très stable aux agents lytiques, son étude par rayons X pouvait à priori conduire à des résultats intéressants. Ainsi, il fut distingué pour la chitine deux structures cristallographiques dénommées forme α et forme β (106) ; la chitine β se transforme en chitine α sous l'action de l'acide nitrique fumant ou de l'acide formique (107).

L'étude des spectres de diffraction des rayons X indique que l'écartement des chaînes dans la chitine β mesure $10,35 \text{ \AA}$ en milieu sec et $11,2 \text{ \AA}$ en milieu humide, alors que la chitine α ne donne pas cette transformation.

L'aptitude des molécules d'eau à s'intercaler dans les chaînes polymériques de la chitine β permet de conclure à une intensité plus faible des liaisons de valence secondaires perpendiculaires à l'axe principal des chaînes ; ce relâchement des liaisons dans la forme β caractérisée par la variation du degré d'hydratation suivant le milieu tient à l'inclusion d'une molécule d'eau par motif monomère soit $\text{C}_8\text{H}_{13}\text{O}_5\text{N}, \text{H}_2\text{O}$. La forme β peut donc être définie comme un hydrate de chitine α (107).

I - Influence du milieu de culture sur la teneur en hexosamine des parois des levures du genre Rhodotorula

Généralement la quantité des hexosamines et surtout de N-acétylglucosamine dans les parois de levures Ascomycètes est réduite. Chez les levures filamenteuses, comme chez certaines espèces des genres Nadsonia et Sporobolomyces, la teneur en glucosamine et en chitine est plus importante (35) (108). La teneur globale en hexosamines des parois des levures varie non seulement suivant le genre, mais aussi selon le milieu de culture et la morphologie cellulaire (7) (109).

Nous avons vu dans le Chapitre III que la teneur en hexosamines dans les parois des levures du genre Rhodotorula est plus élevée que dans d'autres levures, et la teneur globale en hexosamines est nettement plus grande dans les parois lorsque ces levures sont cultivées en milieu V que si elles proviennent du milieu D. Cependant, la présence de cette hexosamine dans les parois ne signifie pas forcément qu'elle soit entièrement sous forme de chitine (35) ; les variations des concentrations de glucosamine, déterminée directement sur les parois peuvent donc ne pas refléter fidèlement les modifications des teneurs en chitine. D'autre

part, l'utilisation des techniques enzymatiques (chitinase) ou spectroscopiques (rayons X) ne nous ont pas permis une détermination quantitative directe de la chitine dans les parois. Ainsi, nous a-t-il paru indispensable de tenter d'isoler la chitine à partir des parois pour essayer de l'évaluer. Afin d'avoir des valeurs de références il nous a paru utile d'obtenir de la chitine témoin à partir de crustacés en appliquant nos techniques de préparation.

II - Préparation de la chitine témoin

La chitine témoin est préparée à partir de carapaces de crevettes débarrassées au maximum de toute chair. Nous avons appliqué dans ses grandes lignes la méthode préconisée par HOUWINK et coll. (58). Ainsi, les carapaces de crevettes sont successivement traitées deux fois, à froid pendant 2 h par une solution d'acide chlorhydrique à 10 % et par une solution d'hydroxyde de sodium à 10 %. Le résidu est traité alors pendant une heure au bain-marie bouillant par une solution d'acide chlorhydrique à 3 % puis pendant 15 minutes au bain-marie bouillant par une solution d'hydroxyde de sodium à 3 %.

Le résidu est lavé jusqu'à neutralité à l'eau distillée puis lyophilisé. A l'examen aux rayons X, le résidu présente les raies caractéristiques de la chitine (Tableau 16).

III - Extraction directe de la chitine par l'acide chlorhydrique à 30 %

C'est le premier procédé utilisé pour l'isolement et la caractérisation de la chitine, il repose sur la propriété de la chitine de se dissoudre dans l'acide chlorhydrique froid à 30 %, ce qui a permis sa mise en évidence dans les parois de levures non filamenteuses (18).

Nous avons appliqué cette technique sur les parois de levures Rhodotorula. Une quantité appropriée de parois correspondant à une concentration finale de 2 % (P/V) est mise en suspension dans l'acide chlorhydrique à 30 %. Le mélange est maintenu à la température du laboratoire avec agitation intermittente pendant 15 h. La suspension est ensuite centrifugée à 5.000 tours par minute pendant 15 minutes. Le culot, après 4 lavages à l'eau distillée est lyophilisé, et constitue le résidu R.

Le surnageant limpide additionné des eaux de lavage est neutralisé par l'hydroxyde de sodium et abandonné 24 h. à la température du laboratoire, il s'y forme un précipité "Pn", (schéma p. 90), recueilli par centrifugation, lavé à l'eau distillée jusqu'à neutralité puis lyophilisé.

1 g de parois + 50 ml HCl 30 %

15 h à la température ambiante
avec agitation intermittente

centrifuger

Culot ou résidu "R"
lavé 4 fois à l'eau
distillée.

surnageant

neutraliser à pH = 7
avec NaOH 1 N

laisser reposer
24 h. à la tem-
pérature ambian-
te

Formation d'un précipité
lavé jusqu'à neutralité
puis lyophilisé

soit "Pn"

Schéma de l'extraction directe de la chitine
par l'acide chlorhydrique à 30 %.

Dans le tableau 15, nous avons rassemblé le pourcentage des résidus R par rapport à la masse des parois de départ ainsi que leur teneur en hexosamines. Bien que ces composés contiennent des hexosamines, ni l'étude aux rayons X, ni l'utilisation de chitinase ne permettent d'identifier la présence de chitine.

Tableau 15

Pourcentage et teneur en hexosamines des résidus R.

Souches	RMP		3044		2200	
Milieu	D	V	D	V	D	V
Pourcentage du résidu R dans les parois	13,7	21,9	3,8	23,4	1,8	1,4
Teneur en hexosamine	40	70	10	50	140	300

- Teneur en hexosamine exprimée en nM glucosamine/mg de produit lyophilisé après hydrolyse chlorhydrique 5,6 M pendant 5 heures.

Les précipités "Pn" dont les quantités varient selon la paroi et le milieu de culture présentent, à l'examen aux rayons X, des raies caractéristiques de la chitine (tableau 16).

L'analyse de ces produits montre qu'ils contiennent des aminoacides, des hexoses et des hexosamines. Or comme on peut le constater, ce sont les parois du milieu V qui fournissent des précipités Pn, non seulement plus riches en hexosamines, mais aussi plus riches en aminoacides (tableau 17).

Tableau 16

RMP.

Chitine de homard		9,54	6,96	5,18	4,65	4,25	3,98		3,38		2,77	2,57	
Raies principales		35	12	20	100	9	10		100		13	30	
Intensité des raies (CARLSTROEM 110)													
Chitine de Crustacés		9	6,8	5,1	4,57	4,24	3,73		3,37	3,01	2,76	2,55	
Raies principales			f	tf	i	tf	tf		i	tf	tf	tf	
Intensité des raies (FALCK et coll. (111))													
Chitine de crevettes		9,65	7,06	5,19	4,59	4,23	3,99		3,36	-	2,75	2,55	2,52
Raies principales		i	f	f	i	f	ti		i	-	f	i	i
Intensité des raies (préparation du laboratoire)													
Produits Pn (D)		ti	-	tf	i	-	-		f	-	tf	f	-
Pn (V)		ti	tf	tf	i	-	-		tf	-	f	i	-
Pt (D)		-	-	tf	i	-	-		tf	-	-	i	-
Pt (V)		-	-	tf	i	-	-		f	-	-	i	-
Ct (D)		i	f	tf	i	-	-		ti	-	-	f	-
Ct (V)		i	f	-	i	-	-		ti	-	tf	i	-

- D et V, parois provenant respectivement de levures cultivées sur milieu D et V

- Des résultats identiques ont été obtenus pour les produits séparés des levures, Rh. glutinis CBS 3044 et Rh. aurantiaca CBS 2200

ti : très intense ; i : intense ; f : faible ; tf : très faible (Appréciation directe visuelle de l'intensité des raies).

Tableau 17

Principales données se rapportant aux précipités "Pn"

Milieu de culture	RMP		3044		2200	
	D	V	D	V	D	V
% de précipité obtenu	2,5	1,4	1,4	6,4	1,8	1,3
Teneur en hexose nM/mg de précipité <u>a</u>	70	175	285	150	350	150
Teneur en aminoacides nM/mg de précipité <u>b</u>	1040	2300	2600	3000	2000	2040
HexN nM/mg de précipité <u>c</u>	1850	3000	1500	3250	1550	2650
HexNac nM/mg de précipité libéré :						
- par Helix pomatia	500	800	170	1130	360	810
- par Chitinase	190	207	100	414	405	3 5
Chitine % dans parois <u>d</u>	0,92	0,84	0,42	4,16	0,56	0,69

a : Méthode de Dubois après hydrolyse par HCl 2 M, 2 h. à 105° en tube scellé.

b : Méthode au DNFB directe après hydrolyse par HCl 6 M, 5 h. à 105° en tube scellé.

c : Méthode d'Elson Morgan après hydrolyse par HCl 6 M, 5 h. à 105° en tube scellé.

d : valeur de HexN du précipité multipliée par le % de précipité et multipliée par 0,20.

HexN = hexosamine

HexNac = N-acétyl hexosamine.

De plus, ce sont les précipités provenant du milieu V qui libèrent davantage d'hexosamines sous l'action de l'hélicase et de la chitinase. Par ce procédé, les taux de chitine trouvés sont, dans l'ensemble, très faibles sauf pour la souche 3044 après culture en milieu V.

Bien que cette technique fournisse des résultats positifs pour la mise en évidence de la chitine dans les parois de levures, il paraît évident qu'elle donne des résultats insuffisants.

L'évaluation quantitative est peut-être inférieure à la réalité du simple fait que la quantité de précipité fournie dépend du pH du milieu et un faible écart du point de neutralité entraîne des variations non négligeables. C'est pourquoi nous n'avons pas poursuivi dans cette voie et nous avons appliqué une technique différente préconisée par certains auteurs ; en raison des traitements plus modérés et des résultats plus fiables.

Ainsi, nous aurons deux séries de résultats obtenus par deux méthodes différentes ce qui permettra une étude comparée.

IV - ISOLEMENT DE LA CHITINE PAR TRAITEMENT MODERE ACIDE ET ALCALIN DES PAROIS

HOUWINK et coll. (58), KREGER (35) puis KORN et coll (40) ont isolé la chitine des parois de S. cerevisiae et des parois de Candida tropicalis par des techniques basées sur des critères d'insolubilité de ce polymère.

C'est ainsi que le traitement de ces parois, tout d'abord par un acide puis par un alcalin à une température de 100° C (au bain-marie bouillant) a permis d'obtenir des résidus qui, examinés aux rayons X, présentent les raies caractéristiques de la chitine.

Pour isoler la chitine des parois de levures Rhodotorula, nous avons appliqué cette technique, précédemment utilisée pour l'isolement de la chitine témoin. Nous obtenons ainsi des sous-fractions Pt qui sont recueillies par centrifugation, lavées jusqu'à neutralité puis lyophilisées.

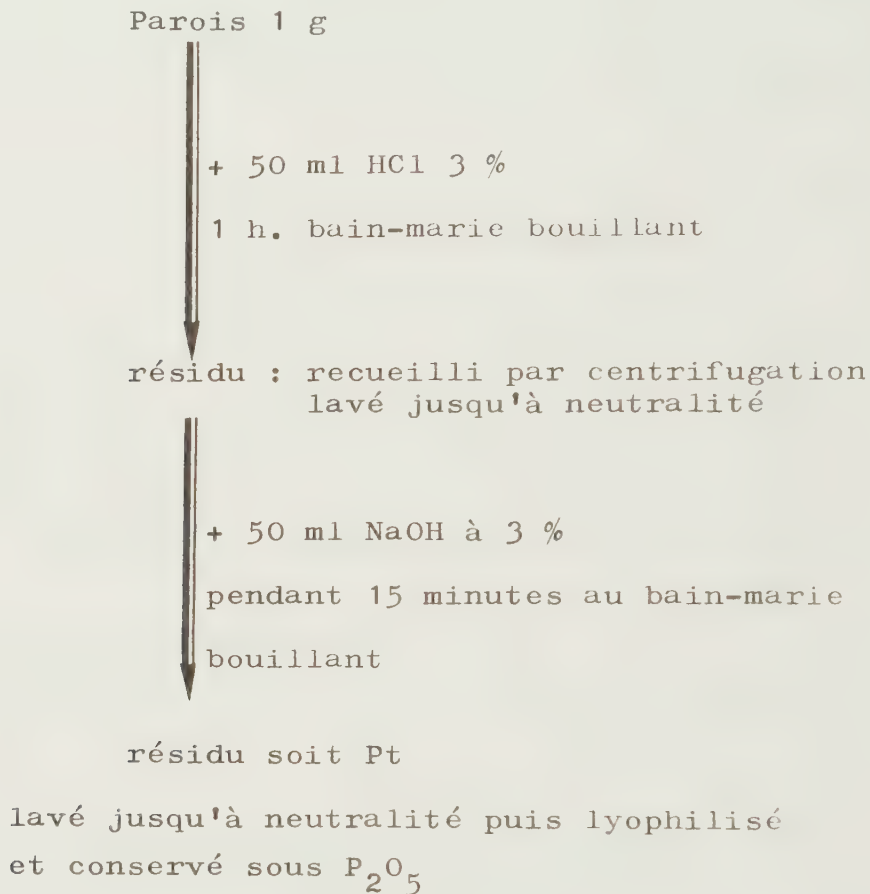


Schéma d'isolement de la chitine à partir des parois par traitements modérés acide puis alcalin.

Isolement des sous-fractions "Pt".

Les teneurs des sous-fractions Pt, obtenues varient selon la souche et le milieu de culture. Nous avons rassemblé dans le tableau 18, les principaux résultats se rapportant à ces résidus. L'examen des spectres de diffraction des rayons X atteste la présence de la chitine (tableau 16).

Les résidus "Pt" présentent par rapport aux résidus "Pn" correspondants, une teneur plus élevée en hexosamines, sauf pour les souches RMP D et 3044 V, et une teneur plus faible en aminoacides. Il en est de même pour la teneur en hexoses.

L'action de l'hélicase et de la chitinase sont toujours positives et l'on observe pour les résidus provenant des parois V une plus forte libération d'hexosamine. Cette technique d'isolement permet d'obtenir des produits plus riches en glucosamine, et de plus faible concentration en aminoacides que ceux isolés par la technique précédente (tableau 19). Pour les résidus "Pt" les concentrations en chitine sont en moyenne deux fois plus élevées que dans les précipités "Pn".

Principales données se rapportant aux résidus "pt"

Milieu de culture	RMP		3044		2200	
	D	V	D	V	D	V
% de résidu recueilli <u>a</u>	5,6	5,4	1,6	21,4	2,0	4,3
Teneur en hexose nM/mg de résidu <u>b</u>	67	80	54	80	54	8
Teneur en aminoacides nM/mg de résidu <u>c</u>	800	1440	800	1030	770	1700
HexN nM/mg de résidu <u>d</u>	1400	4696	3787	2651	4015	3030
Hex Nac nM/mg de résidu libéré par :						
- Helix pomatia	925	925	625	750	625	1175
- chitinase	166	166	143	208	169	312
Chitine % dans parois <u>e</u>	1,57	5,07	1,21	11,34	1,60	2,60

a : quantité de résidu "pt" restant de 100 g de parois lyophilisées
b : Méthode de Dubois après hydrolyse par HCl 2M, 2 h à 105° en tube scellé
c : Méthode du DNFB directe après hydrolyse par HCl 6 M, 5 h à 105° en tube scellé
d : Méthode d'Elson Morgan après hydrolyse par HCl 6 M, 5 h à 105° en tube scellé
e : Valeur de HexN du résidu multipliée par le % et multipliée par 0,2

Tableau 19

Rapport hexosamines/aminoacides dans les produits "Pn et "Pt".

Parois	RMP			3044			2200		
Milieu	D	⋮	V	D	⋮	V	D	⋮	V
Rapport produit "Pn"	1,7	⋮	1,3	0,6	⋮	1	0,77	⋮	1,3
Rapport produit "Pt"	1,7	⋮	3,3	4,7	⋮	2,5	5,2	⋮	1,8

V - ISOLEMENT DE LA CHITINE A PARTIR DES FRACTIONS C

Nous avons vu précédemment (chapitre III) que le traitement des parois par l'éthylène diamine conduit à trois fractions dont une de nature particulière restait insoluble dans l'éthylène diamine et dans l'eau. Cette fraction (très riche en glucosamine, difficilement dégradable, donnait à penser qu'elle pourrait contenir là un dérivé de la chitine.

La teneur en hexosamines est plus élevée dans les fractions provenant de levures cultivées sur milieu V. Le lysozyme, l'hélicase et surtout la chitinase agissent sur les fractions C et libèrent une partie de la glucosamine évaluée d'après l'action de l'acide chlorhydrique 6 M durant 5 heures (tableau 20). La quantité d'hexosamines ainsi libérée est plus élevée dans la fraction C provenant des souches cultivées dans le milieu V.

Produits C :

Hexosamine libérée après hydrolyse par l'acide chlorhydrique et après action de l'hélicase, de la chitinasase et du lysozyme.

Résultats exprimés en nM/mg de produit lyophilisé.

Souche	RMP		3044		2200	
Milieu de culture	D	V	D	V	D	V
HexN libérée par HCl 6N 5 heures	471	462	340	840	481	526
HexN libérée par l'hélicase	80	123	60,5	355	80	160
HexN libérée par chitinasase	16,5	52	16,5	64,5	10,5	52,5
HexN libérée par le lysozyme	19,5	37,5	30	48	34,5	49,5

Valeurs évalués par rapport à la glucosamine.

Il est donc logique de penser que la chitine insoluble dans l'éthylène diamine est localisée dans cette fraction.

Mais la détermination quantitative directe de la chitine dans la fraction C, par voie enzymatique, s'avère décevante, aussi, avons-nous procédé à l'extraction de cette chitine selon le modèle opératoire décrit par HOUWINK et coll. comme indiqué dans le schéma page: 95

Nous obtenons ainsi les sous-fractions "Ct". Les pourcentages de ces sous-fractions varient suivant la souche et le milieu ; nous avons rassemblé dans le tableau 21 les principales données se rapportant à ces résidus.

Les résultats montrent que, dans leur ensemble, ces sous-produits sont plus homogènes, ce qui peut s'expliquer par l'obtention de produits de composition semblable.

Pour tous ces sous-fractions, l'examen aux rayons X, de même que l'action positive de l'hélicase et de la chitinase, attestent la présence de chitine (tableau 16).

Ces sous-produits sont par conséquent plus facilement comparables entre eux pour examiner les différents taux de chitine dans les parois.

Cette dernière technique de préparation de la chitine nous paraît la meilleure. Elle permet non seulement d'avoir des sous-produits non contaminés par des hexoses, mais aussi ayant des taux d'hexosamines semblables pour une même souche cultivée sur milieu D ou V sauf pour la souche 3044 cultivée dans le milieu D.

Tableau 21

Principales données se rapportant au produit Ct

Souche	RMP		3044		2200	
Milieu de culture	D	V	D	V	D	V
% de produit Ct restant	a	9,6	10,1	1,3	17	2,9
HexN libérée par HCl 6 N 5 heures	b	3820	3712	2855	4408	4247
HexNac libérée par :						
- Hélicase	c	920	950	600	570	870
- Chitinase	d	176	166	153	130	193
Amino-acides libérés par HCl 6 N, 15 heures	e	1285	1160	1208	1583	1625

a : Quantité de produit Ct restant pour 100 g de produit C de départ

b, c, d, e : Résultats exprimés en nM/mg de produit Ct.

VI - TENEUR GLOBALE EN CHITINE DANS LES PAROIS D'APRÈS
LES PRODUITS "Pt", "Pn" et "Ct"

La totalité des hexosamines n'entre pas dans la composition de la chitine type, on note en effet une différence de la teneur globale en hexosamines entre les fractions C et les sous-fractions Ct (tableau 22).

L'évaluation de la teneur en chitine dans les sous-fractions "Ct" montre une variation de 0,58 à 12,1 %, dépendant non seulement de la souche, mais aussi du milieu de culture des cellules. C'est ainsi qu'après culture en milieu V, la teneur en chitine est plus forte qu'après culture en milieu D (milieu à base de glucose et d'extrait de levure).

Ceci est bien caractéristique chez les espèces Rh. glutinis 3044 et Rh. aurantiaca 2200, moins net cependant chez Rh. rubra RMP car une telle différence n'est observée que dans les résidus "Pt".

La teneur en chitine "type" dans les parois de levures Rhodotorula étudiées peut être plus élevée que celle rapportée pour les levures Ascomycètes qui ont un taux de 1 à 2 %.

Cette affirmation ne doit pas être généralisée car nous ne pouvons déterminer chez Rh. glutinis CBS 3044, après 4 jours de culture en milieu D, qu'une teneur maximale de 0,6 % en chitine, valeur nettement inférieure aux valeurs habituellement signalées. Par ailleurs cultivées en milieu D les levures Rh. aurantiaca 2200 et Rh. rubra RMP ont une teneur en chitine de l'ordre de 1 à 2 % qui est sensiblement équivalente à celle couramment rapportée chez les autres levures.

Tableau 22

Teneur en chitine des parois calculée à partir des produits C et Ct

Souche	RMP		3044		2200	
	D	V	D	V	D	V
HexN : nM/mg de produit C	a	471,00	462,00	840,00	481,00	526,00
HexN : nM correspondant aux produits Ct	b	366,72	374,91	749,32	163,16	297,00
HexN éliminée par le traitement (a-b = c)	c	104,28	87,09	100,64	317,84	229,00
Quantité de produit C mg/g de parois (1) (109)	d	510	590	810	760	860
Teneur de produit Ct mg/g de parois	e	48,9	59,6	137,11	22	56,7
Chitine : teneur en mg/g de parois.	f	37,40	44,30	121,00	18,70	50,00
Rapport	g	1	1,2	21,0	1	2,7

f : Teneur calculée en multipliant par 0,2 la valeur de HexN dans les produits Ct

g : Rapport chitine paroi V/chitine paroi D.

Une partie peptidique est constamment liée à la chitine et seule une hydrolyse par l'acide chlorhydrique 6 M de 5 à 10 heures permet de séparer aminoacides et hexosamines. Cette partie peptidique qui est donc covalentiellement fixée à ce polymère, est de l'ordre de 12,5 à 36 % dans les produits "Pn", de 9,3 à 20 % dans les produits "Pt" et de 14,5 à 20,5 % dans les produits "Ct". C'est elle qui, en formant avec l'amino-polysaccharide un complexe que JEUNIAUX appelle la chitine masquée (98), peut être responsable de la faible action chitinasique de l'hélicase et de la chitinase sur les différents produits.

Le reste de la glucosamine dans les parois se trouve impliqué dans diverses combinaisons. En effet, il est à noter que dans les fractions C, si une quantité de glucosamine se retrouve dans les sous-fractions "Ct", donc dans la chitine, le reste est solubilisé par les traitements acide et alcalin et par conséquent non inclus dans la chitine. Cette glucosamine ainsi solubilisée est encore incluse dans des fragments polymériques car une hydrolyse par HCl 4 N, 4 heures, est nécessaire pour la libérer. Ces fragments sont pratiquement insensibles, à l'action des enzymes lytiques (chitinase, hélicase, lysozyme et glucosidase). La structure de ces fragments reste encore à définir ; c'est dans les parois issues du milieu D, c'est-à-dire dans celles qui renferment le moins de chitine et le moins d'hexosamine au total, que l'on retrouve une quantité plus importante d'hexosamine sous cette forme.

Ce résultat étaye l'hypothèse selon laquelle il existe dans les parois des quantités importantes de complexes à base de glucosamine et différents de la chitine : il peut s'agir de complexes du type N-aspartyl- β -D-N-acétylglucosaminide intervenant comme lien entre les parties glucidiques et peptidiques (42), mais il peut également s'agir de

polymères à base de N-a cétylglucosamine, proches de la chitine "type" mais qui s'en différencient par leurs propriétés physiques et cristallines. Ces polymères d'hexosamines peuvent être rapprochés de ceux observés dans les parois de Saccharomyces hors des cicatrices de bourgeonnement (58), et de ceux mis en évidence dans les parois de Pityrosporum ovale (112). L'étude de ces produits demande à être approfondie.

Enfin, si la chitine est essentiellement localisée dans les fractions C, nous avons vu dans le chapitre précédent que ces fractions ont une structure morphologique sensiblement identique à celle des parois lyophilisées. Il n'est donc pas déraisonnable de penser que cette chitine puisse jouer un rôle important dans la constitution de la charpente des parois de ces levures.

CHAPITRE V

UTILISATION D'ENZYMES DANS L'ETUDE STRUCTURALE DES PAROIS

Les avantages essentiels des hydrolyses enzymatiques résident dans la possibilité d'obtenir à la fois des renseignements sur les types de liaisons existants dans les différentes chaînes de polymères, sur la localisation de certains composés dans l'édifice de la paroi et dans la possibilité d'isoler certains ensembles macromoléculaires intacts. Toutes ces opérations se réalisent dans des conditions douces et ne donnent pas à des dégradations secondaires, toutefois, l'utilisation des systèmes enzymatiques se heurte à certaines limites et se révèle même inopérante en raison de la nécessité de démasquer au préalable les sites spécifiques des substrats lorsque, pour des raisons d'encombrement stérique, l'approche des liaisons vulnérables n'est pas possible. C'est ainsi que les parois isolées de S. cerevisiae peuvent être lysées par l'action de glucanases, mannanases et d'enzymes protéolytiques (44) (45) (46) (47), mais sur des cellules entières les parois restent cependant difficilement accessibles aux systèmes enzymatiques en raison de la présence et de la disposition spatiale de phosphomannanes qui tapissent la surface extérieure de l'enveloppe cellulaire. Il sera donc nécessaire d'utiliser en premier une phosphomannanase d'origine bactérienne, qui en hydrolysant la couche de phosphomannane rend possible une hydrolyse totale des parois des cellules intactes par les glucannases.

L'hydrolyse par voie enzymatique associée à l'étude physico-chimique contribue à parfaire nos connaissances sur la structure des parois des levures. En effet, l'action spécifique des systèmes enzymatiques sur les liaisons particulières dans les parois isolées permet de confirmer des résultats recueillis par les investigations chimiques.

L'action positive des β glucanases a montré la présence de liaisons β 1 $\longrightarrow$ 3 et β 1 $\longrightarrow$ 6 dans les parois de S. cerevisiae (114). L'utilisation par GORIN et coll. (115) d'une mannosidase élaborée par Arthrobacter GJM-1, qui hydrolyse spécifiquement des liaisons α 1 $\longrightarrow$ 6 D mannopyranose, a permis de déterminer les enchaînements des mannanes des parois de plusieurs souches de levures telles que Candida parapsilosis, Saccharomyces rouxii et Torulopsis bombi. De leur côté NAGASAKI et coll. (116) ont réussi à dégrader les parois de S. cerevisiae par des enzymes excrétées dans le milieu de culture de Bacillus circulans.

Enfin, rappelons que l'action du suc d'Helix pomatia a été largement utilisé depuis les travaux de GIAJA en 1914 qui remarqua que les escargots (Helix pomatia) avaient la possibilité de digérer les levures. HOLDEN et coll. (117) ont étudié la composition de ce suc et ont pu y démontrer la présence d'une trentaine d'activités enzymatiques très différentes. Plus tard, ANDERSON et MILBANK (81) ont pu séparer du suc par filtration sur gel Sephadex G 100, plusieurs fractions qu'ils ont testés sur les parois de S. cerevisiae.

Dans notre étude sur les parois des levures Rhodotorula, nous savions, par une série d'études préliminaires, que ces éléments cellulaires n'étaient pas lysés sous l'action des glucannases dont nous disposions. Même sous l'action de l'hélicase, les parois de ces Rhodotorula ne subissent pas une lyse complète et une incubation préalable avec du dimercaptoéthanol ne modifie en rien l'action lytique du suc d'escargot. Le dérivé sulfhydrilé est en effet utilisé dans ce cas pour rompre les ponts disulfures existants dans la copule protéique des parois de Saccharomyces. La rupture des ponts disulfures entraîne une dégradation des glucannes. Or, nous avons vu que la composition chimique des parois de Rhodotorula ne contient pas d'acides aminés soufrés, cette absence peut expliquer l'inactivité du mercapto-éthanol et, de ce fait, empêcher l'action ultérieure profonde des glucannases.

I - ACTION DE L'HELICASE SUR LES PAROIS DES LEVURES RHODOTORULA

Bien que l'action de l'hélicase sur les parois des levures Rhodotorula ne conduise pas à un effet spectaculaire, cette dernière cependant libère en plus des hexoses neutres, des quantités variables d'hexosamines. Dans le tableau 23, nous indiquons les différents résultats obtenus après action de ce système enzymatique.

A côté des hexoses et hexosamines dosés, très vraisemblablement une quantité non négligeable d'acides aminés est libérée ; une estimation s'avère cependant imprécise en raison de la teneur importante en protéine du suc d'escargot.

Tableau 23

Souches	RMP		3044		2200	
Milieu	D	V	D	V	D	V
Hexosamines*	255	370	240	745	406	616
Hexosamines libérées par l'hélicase	17	105	30	229	26	121
N-acétyl hexosamines libérés par hélicase	18,2	108	24,2	225	23,5	130

- Résultats exprimés en nmoles de composés libérés par mg de parois lyophilisées.

L'incubation est réalisée comme décrit dans Matériel et Méthodes. Durée de l'incubation 24 heures à 37° C. Agitation intermittente.

* Taux des hexosamines évaluées après hydrolyse chlorhydrique 6 M (2-5) heures à l'étuvée à 105° C en tube scellé.

Résultats exprimés en glucosamine.

De même que nous avons observé des différences dans l'hydrolyse acide des parois suivant les milieux de culture des cellules, il apparaît que l'hydrolyse enzymatique conduit à des résultats variables également liés aux conditions de culture à partir des parois de levures issues du milieu V. Ainsi, peut-on observer que les enzymes du suc d'escargot libèrent davantage de monomères. L'analyse des oses neutres libérés indique que les 4 sucres glucose, galactose, mannose et fucose se retrouvent dans l'hydrolysatsans que l'on puisse observer de différence nette de leur répartition en fonction du milieu. Les taux de glucosamine et de N- acétylglucosamine libérés par l'hélicase sont extrêmement proches ce qui fait apparaître que toutes les molécules d'hexosamines se trouvent sous forme acétylées dans les parois. Il existe cependant (entre les parois) une différence marquée quant aux quantités libérées.

Ainsi, pour les trois souches RMP, 3044, 2200 après culture en milieu D, l'hélicase libère respectivement environ 7 à 8 % des hexosamines totales des parois (en hexosamine libérable par hydrolyse chlorhydrique) tandis qu'après culture sur milieu V l'hélicase en libère respectivement 28,5 - 30,5 et 19 %.

Cette différence de libération de N-acétylglucosamine (ou ce qui revient au même, d'hexosamine), par l'hélicase suivant les parois, doit être la conséquence soit d'une structure totalement différente de ceux-ci, soit d'une localisation particulière des polymères à base de N-acétylglucosamine, chitine en particulier et cela suivant la souche de levure et le milieu nutritif.

Une telle différence de sensibilité à l'hydrolyse enzymatique a été récemment rapportée par KILLICK (10). Cet auteur a montré que les cellules de Candida utilis et de S. cerevisiae sont plus sensibles à l'hélicase après culture dans un milieu riche en aminoacides soufrés, ce qui s'explique

par la présence d'un plus grand nombre d'acides aminés soufrés dans les parois de ces levures. Ce même auteur, en utilisant des conditions de culture semblables pour Rh. aurantiaca, observe au niveau des parois de cette levure des modifications morphologiques et chimiques qui les rendent plus sensibles à l'hélicase (118).

Pour comprendre ce qui se produit au niveau des parois des trois levures Rhodotorula étudiées, une première explication est fournie par le microscope électronique qui donne des images très différentes de l'aspect morphologique des parois D et V.

La structure de la paroi des levures apparaît en effet bien différente suivant les conditions de culture des cellules. Par ailleurs l'action de l'hélicase, qui libère davantage d'hexoses des parois des microorganismes cultivés en milieu V, plaide en faveur d'une structure moins stable pour ces dernières.

Afin de compléter ces données préliminaires, nous avons soumis des levures entières et des parois isolées à des traitements enzymatiques plus spécifiques : préparation de cellulase - pronase et complexe β glucannase.

II - TRAITEMENT DES PAROIS ET DES CELLULES ENTIERES PAR DIVERS SYSTEMES ENZYMATIQUES

a) - Traitement des parois par la cellulase de Trichoderma viridie (Worthington)

Nous avons indiqué dans le chapitre "Matériel et Méthodes" que la préparation de cellulase de Trichoderma viridie (Worthington) à notre disposition n'a pas un très grand degré de pureté et contient au moins deux activités osidasiques, l'une 1 $\longrightarrow$ 4 osidasique, l'autre 1 $\longrightarrow$ 3 osidasique. Son action sur les parois ne libère pas d'acides aminés et pas d'hexosamines, mais seulement du glucose et du mannose à l'état monomère. L'analyse chromatographique des

produits de l'hydrolyse indique que la quantité d'hexose libérée est supérieure à partir des parois V que des parois D comme l'indique le tableau 24.

Tableau 24

Répartition molaire du glucose et du mannose libérés à partir des parois de *Rhodotorula* après action de la cellulase.

Souche	RMP		3044		2200	
Milieu	D	V	D	V	D	V
Glucose	220	495	385	440	550	440
Mannose	165	495	385	495	220	825

- Résultats exprimés en nmoles/mg de parois lyophilisées par la technique chromatographique selon la méthode de DATE.

b) - Action des enzymes lytiques : pronase, hélicase "complexe glucannase"

Nous avons soumis parallèlement les cellules entières et les parois des microorganismes correspondants à l'action d'enzymes lytiques déjà utilisées pour de telles études (Tableaux 25 et 26).

Nous avons constaté que la pronase, dont l'action concerne spécifiquement les peptides, et le "complexe β glucannase", qui dégrade surtout les polymères osidiques liés en 1 $\longrightarrow$ 3 et 1 $\longrightarrow$ 6, libèrent tous les deux à la fois des glucides neutres, des aminoacides et pratiquement pas d'hexosamines.

En ce qui concerne la libération d'hexosamines par action ultérieure de l'hélicase, nous n'avons pas observé de variations notables que le substrat soit traité directement ou soumis au préalable à l'action de la pronase ou du

"complexe β glucannase".

Il apparaît aussi que ce sont toujours les parois issues du milieu V, c'est-à-dire les plus pauvres en protéines (109) qui libèrent davantage d'acides aminés sous l'action de la pronase et du complexe β glucannase, et ces observations restent valables aussi bien pour les levures entières que pour les parois seules.

Or, selon la plupart des auteurs, un des rôles de la partie protéique dans les parois des levures est de servir de lien entre les polysaccharides (47), il semble donc que l'élimination plus importante d'acides aminés reflète là aussi une structure pariétale plus facilement dégradable pour les parois V.

C'est en utilisant de tels systèmes enzymatiques que la localisation des différents polymères a pu être définie chez certaines levures. Ainsi fut-il déterminé chez les levures Saccharomyces que la chitine est en grande partie située au niveau des cicatrices de bourgeonnement (18) (58). Une telle disposition n'est pas extrapolable à toutes les levures, chez certaines espèces de Cryptococcus, les parois renferment une forte teneur en chitine qui n'est pas spécifiquement localisée au niveau des cicatrices (119), il en est de même chez Candida albicans qui possède sous forme mycelium trois fois plus de chitine que sous forme levure (4).

La localisation de la chitine dans les parois des levures Rhodotorula étudiées demandait à être précisée.

Nos essais à l'aide de l'hélicase, de pronase et du complexe β glucannase ne permettent pas de situer la chitine dans un endroit précis de la paroi. Le fait que la glucosamine soit moins facilement libérée à partir des cellules entières qu'à partir des parois isolées, semble indiquer que la chitine est située dans la partie interne de la paroi.

Traitement des cellules entières par la pronase, le complexe β glucannase et l'hélicase.
 Résultats exprimés en nM de composés libérés par mg de levure sèche.*

	Hélicase	Pronase		Pronase puis Hélicase	Complexe β glucannase			glucannase puis hélicase
	HexN libérée	NH ₂ libérés	Hexoses libérés	HexN libérée	NH ₂ libérés	Hexoses libérés	HexN libérée	HexN libérée
RMP D	7,7	707	226	traces	328	161	traces	8
RMP V	48	72	90	traces	41	210	4,4	46
3044 D	5	432	220	2,8	150	180	1	8
3044 V	94	240	63,8	traces	41	108	2,7	93,3
2200 D	10,2	20	76	traces	60	50	traces	7,8
2200 V	39	300	82	traces	200	68	traces	61

*La concentration en levure est déterminée de la manière suivante :

- un volume déterminé contenant la levure en suspension homogène est mesuré puis ce mélange est desséché jusqu'au poids constant.

Traitement des parois par la pronase, le "complexe β glucannase" et l'hélicase.
 Résultats exprimés en nM de composés libérés par mg de parois lyophilisées.

	Hélicase	Pronase		Pronase puis Hélicase		complexe β glucannase		glucannase puis hélicase
	HexN libérée	NH ₂ libérés	Hexoses libérés	HexN libérée	HexN libérée	Hexoses libérés	HexN libérée	- HexN libérée
RMP D	17	360	94	traces	15,5	45	traces	24
RMP V	105	696	180	traces	30	110	43	65
3044 D	30	320	172	traces	20	45	5,3	45
3044 V	229	540	148	traces	158	120	60	200
2200 D	26	160	177	traces	17	30	traces	26
2200 V	121	368	159	traces	64	75	5,3	85

Le pourcentage de glucosamine libérée par l'hélicase à partir des parois V est plus important que celui libérée à partir des parois D. Ceci résulterait plutôt d'une architecture plus fragile des parois V que d'une localisation différente de la chitine dans ces parois. En effet, nous avons montré précédemment (109) que la faible teneur en aminoacides dans les parois V pouvait être responsable d'une structure moins dense de la paroi.

Par ailleurs, l'examen au microscope électronique des fractions C provenant des parois issues du milieu V, révèle une structure plus disloquée (chapitre III). Enfin, les parois issues du milieu V sont plus facilement altérées par l'attaque enzymatique que les parois issues du milieu D.

Il se dégage de ces résultats que l'action des enzymes lytiques individuelles ou couplées tant sur les levures entières que sur les parois ne conduit qu'à des clivages limités surtout en ce qui concerne les hexosamines et que les parois issues du milieu V sont sensiblement plus vulnérables, ce qui est en relation directe avec l'examen microscopique des fractions C des parois issues du milieu V, et qui révèle une structure plus disloquée que celle des fractions C des parois issues du milieu D.

DEUXIEME PARTIE

ETUDE DE LA STRUCTURE D'UNE GLYCOPROTEINE ISOLEE DES
PAROIS DE Rhodotorula rubra

Les études réalisées par BELL et NORTHCOTE (85) sur un glucanne isolé à partir des parois de Sacch. cerevisiae ont montré l'existence de chaînes polysaccharides ayant des liaisons $1 \longrightarrow 3$ et $1 \longrightarrow 2$. Ultérieurement, PEAT et coll. (22) ont confirmé la présence des chaînes de glucose de type $1 \longrightarrow 3$, mais n'ont pas mis en évidence dans les préparations la présence de glucannes ayant des liaisons de type $1 \longrightarrow 2$; cependant les travaux de ces auteurs ont caractérisé la présence de liaisons $1 \longrightarrow 6$ (23).

Plus tard, l'ensemble des travaux de MISAKI et coll. (24), MANNERS et PATTERSON (121), puis ceux de BACON et coll. (25) et MANNERS et MASSON (26) ont démontré la présence de deux types de liaisons $1 \longrightarrow 6$ et $1 \longrightarrow 3$ dans les glucannes isolés des parois de Sacch. cerevisiae. Nous devons également rappeler que BISHOP et coll. (86) ont obtenu des résultats analogues sur des glucannes obtenus à partir des parois de Candida albicans, forme levure.

En ce qui concerne les polymères de mannose, les travaux de HAWORTH et coll. (29) (30), et PEAT et coll. (88) (31) ont démontré la présence de deux types de liaisons $1 \longrightarrow 6$ et $1 \longrightarrow 2$ dans les mannanes extraits des parois de levures S. cerevisiae. GORIN et coll. (122), puis JONES et coll. (123) ont obtenu des résultats analogues après acétolyse. Enfin les travaux récents de STEWART et coll. (124) (125) tendent à prouver que la structure des chaînes de mannanes des parois des levures Sacch. cerevisiae est constituée d'oses en liaisons $1 \longrightarrow 6$, $1 \longrightarrow 2$, et $1 \longrightarrow 3$.

La structure des mannanes isolés à partir d'autres genres de levures est moins bien étudiée ; cependant les travaux de BISHOP et coll. (86), de GORIN et SPENCER (126) effectués sur des composés extraits des parois de levures du genre Candida ont permis d'envisager une structure qui ressemble à celle des mannanes de Sacch. cerevisiae ou Sacch.

rouxii. Les parois des levures du genre Rhodotorula n'ayant fait l'objet que d'un nombre limité de recherches, la structure des différents polysaccharides de ces parois reste à préciser. Seuls les travaux de GORIN et coll. (127) ont permis de mettre en évidence des liaisons de type β 1 $\longrightarrow$ 3 et β 1 $\longrightarrow$ 4 dans les mannanes extracellulaires trouvées dans le milieu de culture de Rhodotorula glutinis.

L'obtention de fractions hydrosolubles et de nature glycoprotéique (chapitre III) après traitement des parois par l'éthylène diamine, nous a conduit à en effectuer une analyse détaillée. Nous avons choisi plus particulièrement la fraction A des parois de la souche RMP, après culture en milieu V, pour les raisons suivantes : d'une part, c'est la fraction A des parois de Rh. rubra RMP, cultivée en milieu V, qui possède la composition chimique la moins complexe, avec un taux d'acide aminé faible associé à une composition glucidique simple, constituée de glucose, mannose et glucosamine ; d'autre part, ce sont les parois de la souche Rh. rubra RMP qui fournissent la quantité la plus importante de fraction A soluble.

Les produits contenus dans cette fraction A représentent 9,6 % de la masse des parois. L'analyse chimique brute montre qu'elle est exempte de phosphore, qu'elle a une teneur en oses neutres de 86 % et d'acides aminés de 10 %, d'autre part, elle renferme 0,56 % d'hexosamines.

Filtration sur gel de la fraction A

Un échantillon de 500 mg de fraction A est filtré sur gel Sephadex G50-G25 (système à deux colonnes (180 x 2 cm) montées en série). Le déplacement des composés est effectué avec une solution d'acide acétique 0,1 N. Le repérage des constituants présents dans l'effluent (Fig. 9) est réalisé en dosant les glucides par la méthode au phénol sulfurique de DUBOIS (67) et les groupes NH_2 par la technique au dinitrofluorobenzène. Cette première filtration conduit à deux sous-

fractions Aa' et Ab'.

Dans le tableau 27, nous avons représenté les pourcentages de ces deux sous-fractions dans trois fractionnements effectués au cours de notre étude.

Tableau 27

Pourcentage des sous-fractions Aa' et Ab' après gel filtration sur Sephadex G50 - G25.

	Aa'	Ab'
1ère expérience	28,5	50
2ème expérience	27	50
3ème expérience	24	55
Moyenne	26	52

Nous constatons d'après ce tableau que les deux sous-fractions Aa' et Ab' se trouvent dans un rapport de 1/2. Le déficit en pourcentage doit provenir en majeure partie de la mutiplicité de dosages effectués et de la perte pendant la récupération des produits des différentes fractions collectées.

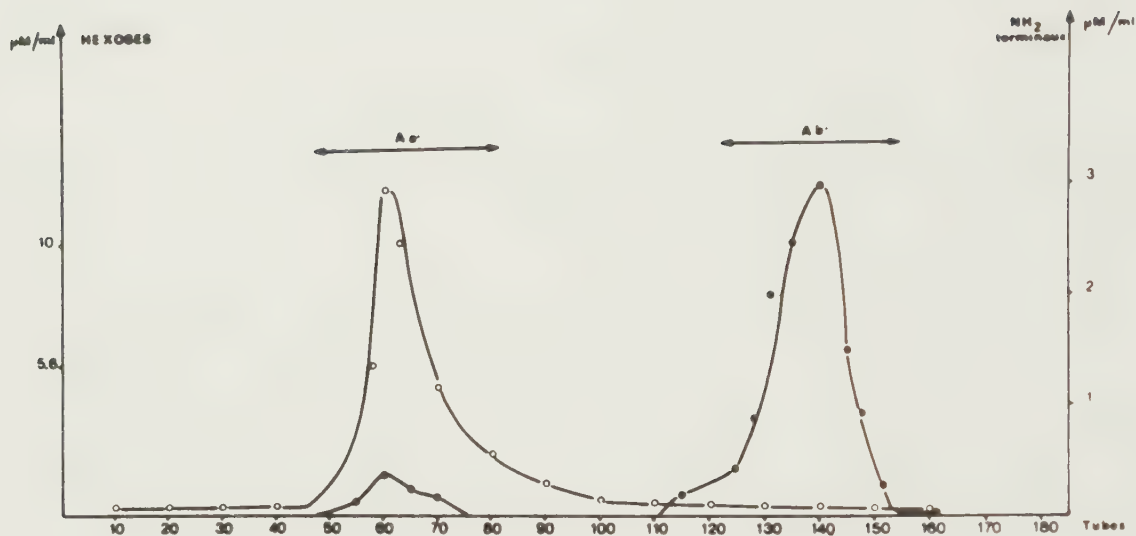


Fig. 9 : Diagramme d'élution sur Sephadex G50 - G25 de la fraction A

Colonnes montées en série : volume de la colonne 1
de Sephadex G 50 = 450 ml

volume de la colonne 2
de Sephadex G 25 = 480 ml

Débit de 0,28 ml/minute =
fraction de 7 ml.

Liquide d'élution CH_3COOH 0,1 N

○ ○ ○ Dosage des oses totaux par la méthode de Dubois

● ● ● Dosage des aminoacides par la détermination des groupes-
aminés par le dinitrofluorobenzène.

1 - Etude de la sous-fraction Ab'

La sous-fraction Ab' incluse dans le gel Sephadex G25 est exempte de sucre ; en effet la recherche des glucides par chromatographie sur papier ainsi que par des réactions spécifiques (Dubois, Anthrone, Park et Johnson) sont toutes restées négatives avant et après hydrolyse. La recherche des hexosamines s'est révélée également négative tant par des techniques chromatographiques que par des techniques chimiques.

Les produits peptidiques de cette sous-fraction Ab' sont homogènes à l'électrophorèse, ainsi, l'électrophorèse en tampon acide (acide acétique - pyridine - eau, 9-2-1000 v/v) pH 3,9 et en tampon basique (1 g% de tétraborate de sodium), pH 9,2 n'a pas permis de séparer des peptides ou des oligopeptides. La chromatographie sur résine échangeuse d'ions (Chromobeads A) à l'autoanalyseur Technicon, n'a pas permis de détecter la présence d'acides aminés libres.

La composition globale en acides aminés de ces produits est rapportée dans le tableau 28. On y trouve l'ensemble des acides aminés déjà présents dans les parois de cette levure sauf l'arginine, en plus on note un enrichissement relatif en glycine et lysine. Cette protéine Ab', libérée des parois sous l'action de l'éthylène diamine, peut représenter des restes de ponts interpeptidiques reliant entre eux des polysaccharides des parois ou des restes de protéines enzymatiques localisées dans la paroi.

Tableau 28

Concentration et rapport molaire des aminoacides de Ab¹

	Concentration	Rapport
acide aspartique	7	0,35
Thréonine	3	0,15
Sérine	6	0,25
Acide glutamique	7	0,38
Proline	traces	-
Glycine	31	1,55
Alanine	7	0,35
Valine	3	0,15
Cystine	0	-
Méthionine	0	-
Isoleucine	2	0,1
Leucine	5	0,25
Tyrosine	2	0,1
Phénylalanine	2	0,1
Ornithine	6	0,3
Lysine	20	1
Histidine	1	0,05
Arginine	0	0

- Résultats exprimés en nmoles/mg après hydrolyse chlorhydrique 6 M en tube scellé à 105° C pendant 18 h

Rapports exprimés en fonction de la teneur en lysine

Protéines à dominante cationique (basique). Masse moléculaire minimum approchée = 10.000

2 - Etude de la sous-fraction Aa'

La sous-fraction Aa' est composée d'acides aminés, de glucides (mannose et glucose) et d'hexosamines. Une filtration sur gel Sephadex G100 - G 75 (colonnes Sephadex K16/80, montées en série) permet de séparer trois composés.

L'élution est réalisée avec l'eau distillée et le repérage des constituants glucidiques et aminés dans l'effluent est réalisé comme précédemment. Après lyophilisation, les trois fractions Aa'/1, Aa'/2 et Aa'/3 (Fig. 10) se trouvent dans un rapport pondéral de 3/1/1/

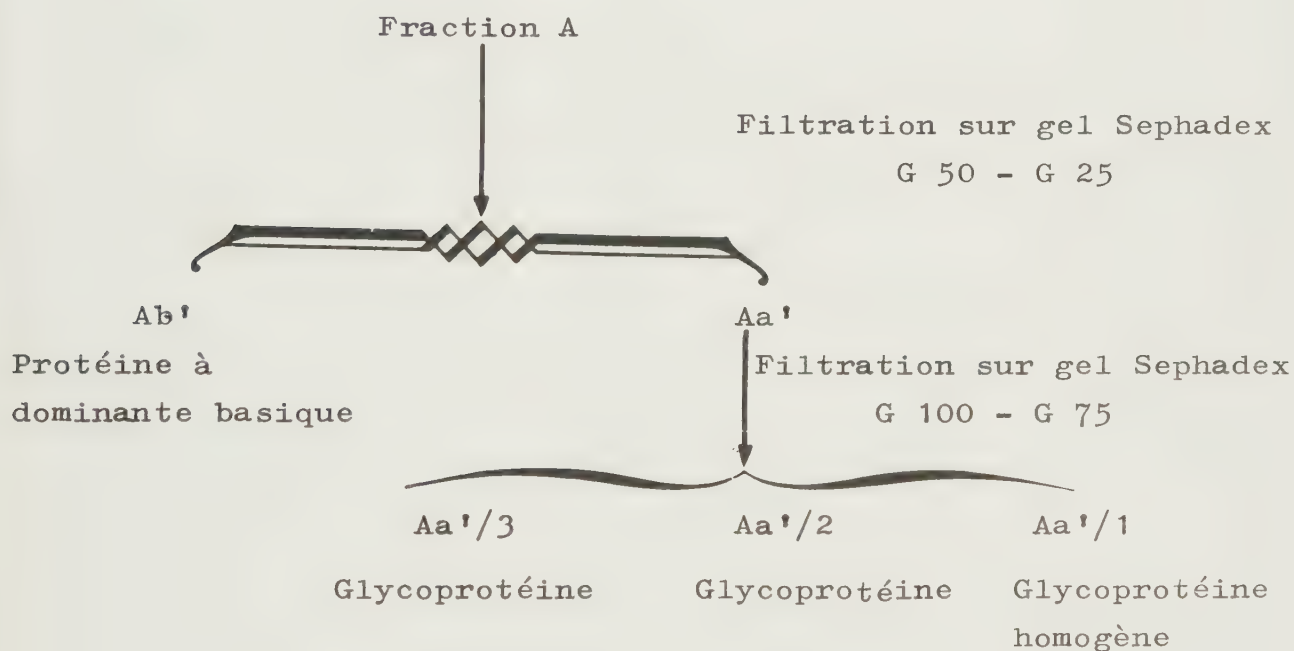


Schéma de fractionnement du produit A

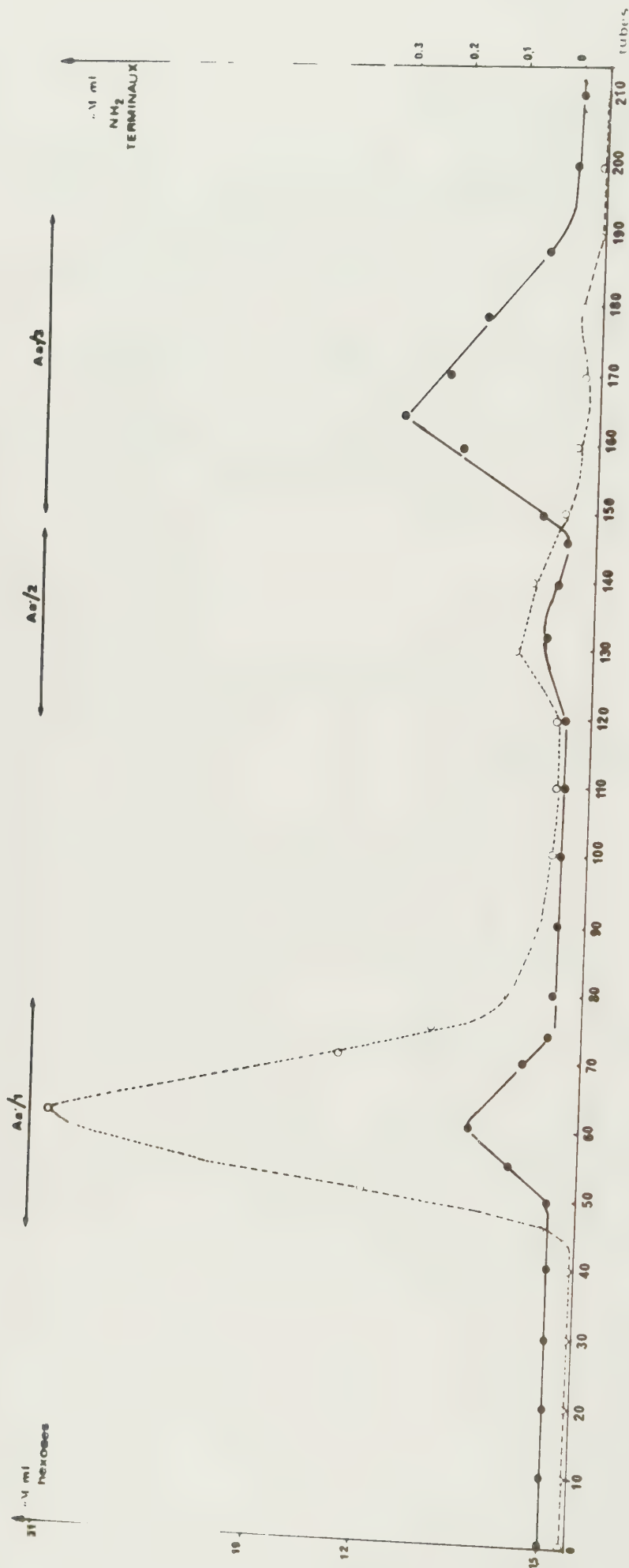


Fig. 10 : Diagramme d'élution sur Sephadex G100 - G75 de la fraction Aa'

Colonnes montées en série : volume de chaque colonne 340 ml

débit de 0,11 ml/minute, fraction de 3,6 ml

Liquide d'élution : H_2O distillée

- ○ ○ ○ Dosage des oses totaux par la méthode de Dubois au phénol sulfurique
- ● ● ● Dosage des groupements aminés par le dinitrofluorobenzène.

Etude de Aa'/1

a) Critère d'homogénéité

A l'état lyophilisé, la sous-fraction Aa'/1 se présente comme une substance blanchâtre cotonneuse. Elle est incluse dans le Sephadex G 150 (Fig 11) dont elle s'élue en pic symétrique, ce qui implique un poids moléculaire : $5.10^4 < PM < 5.10^5$.

L'électrophorèse à pH 3,9 en tampon de MICHL (73) et à pH 9,2 en tampon de tétraborate de sodium à 1 %, montre la présence d'une seule bande, révélable par le nitrate d'argent alcalin (caractéristique des oses), et par le réactif au chlore benzidine (caractéristique des aminoacides). De plus, l'électrophorèse sur acétate de cellulose en tampon pH 6,9 ne donne qu'une seule bande, révélable par le réactif de SCHIFF (128) et par le réactif à l'amidoschwartz. Cette double révélation établit à la fois la présence de sucres réducteurs et d'aminoacides dans cette sous-fraction.

Par ailleurs, la chromatographie sur résine Dowex 50 w x 8 (100 à 200 mesh) forme H^+ , ne permet pas de séparer, même partiellement une partie glucidique d'une partie protéique. Tous ces résultats sont en accord avec un produit homogène de nature glycoprotéique.

Le diagramme d'ultracentrifugation effectué à pH acide 4,7 (tampon phosphate 0,1 M) à pH basique 8,42, tampon tris HCl 0,1 M) et à pH neutre 6,9 (tampon phosphate 0,1 M) (Planche VII) ne fait apparaître qu'un seul pic, ce qui montre bien que l'on se trouve en présence d'un produit homogène. Calculé par ultracentrifugation, le poids moléculaire est de $6,4 \times 10^4$ et la constante de sédimentation, S est de 1,92.

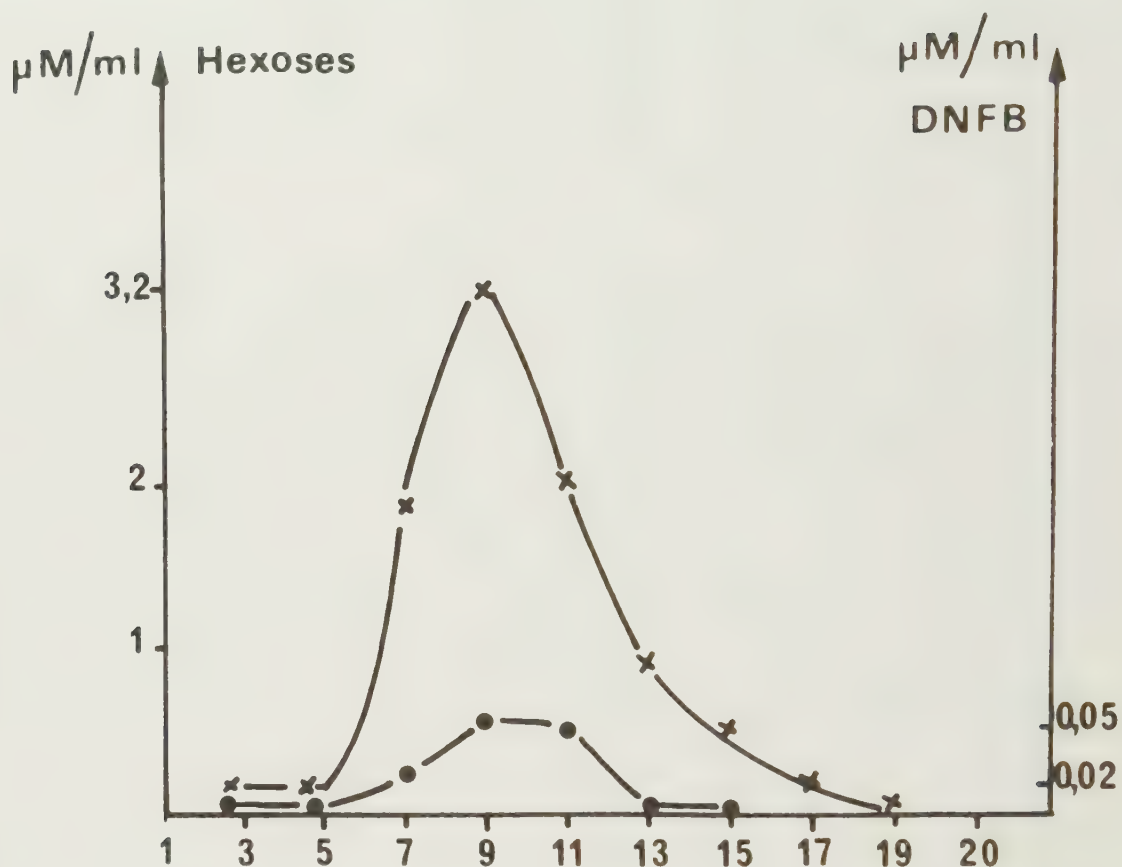


Fig. 11 : Diagramme de filtration sur Sephadex G 150 du produit Aa' / 1

Colonne : volume 60 ml

Fraction de 4,5 ml

Débit 0,3 ml/minute

Liquide d'élution : H₂O distillée

x x x Dosage des hexoses par la technique de Dubois au Phénol sulfurique.

• • • Détermination des groupements aminés par le dinitro-fluorobenzène.

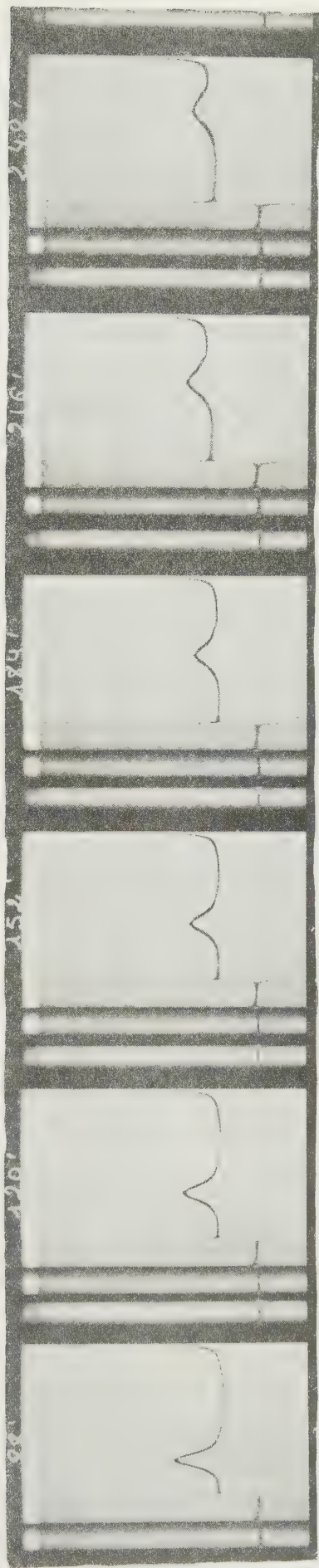
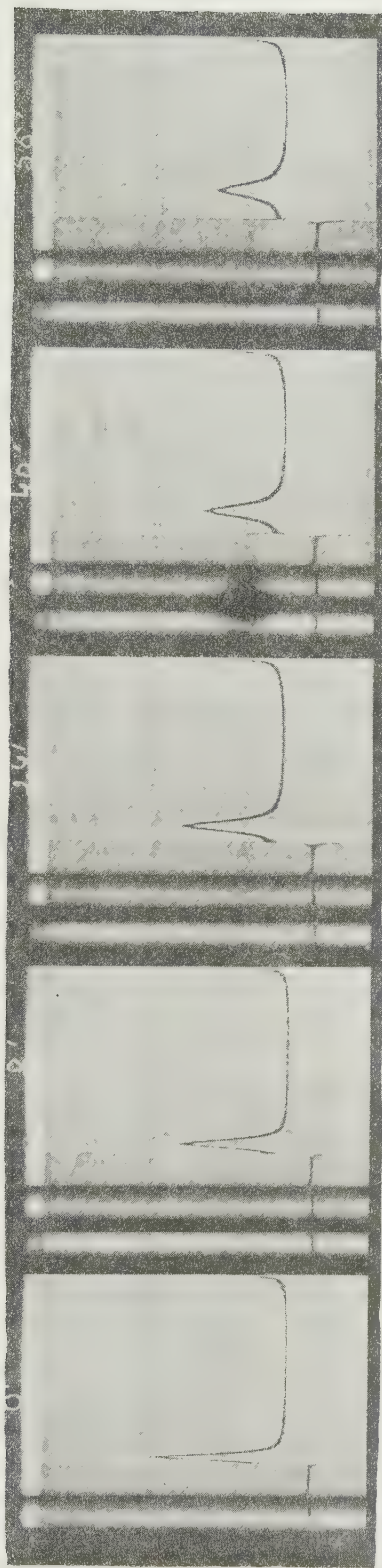


Diagramme d'ultracentrifugation du produit Aa'/1 à 20°C, pH 6,9 , phosphate 0,1 M

Le produit Aa'/1 ainsi isolé des parois de Rh. rubra peut être comparé à divers autres composés de nature glycoprotéique isolés d'une manière semblable des parois de levures Saccharomyces.

Les travaux originaux de KORN et NORTHCOTE en 1960 ont montré que la majeure partie du produit A extrait par action de l'éthylène diamine sur les parois de Sacc. cerevisiae est constituée d'un complexe "mannanes-protéines" ayant un poids moléculaire $9,8 \times 10^4$. Ces auteurs ont précisé, qu'au cours des traitements, on pouvait observer en outre la présence, dans les diagrammes d'ultracentrifugation, d'un autre composé dont la quantité diminue en fonction de la durée du traitement. Ainsi, après 72 heures d'action de l'éthylène diamine sur les parois de Sacc. cerevisiae, le second pic visible dans les diagrammes de l'ultracentrifugation ne présente plus qu'une importance négligeable. Selon KORN et NORTHCOTE le produit A n'est qu'un élément partiel d'un grand complexe manno-protéique pouvant être le constituant essentiel des parois de Sacc. cerevisiae.

Les travaux ultérieurs de SENTADREU et NORTHCOTE (41) sur ce produit A de Sacch. cerevisiae ont permis d'obtenir après traitement par la pronase un composé homogène à l'ultracentrifugation, ayant un poids moléculaire de $7,6 \times 10^4$ et constitué de mannose et d'acides aminés.

Enfin, notons que le traitement des parois de Sacch. cerevisiae par la soude selon le procédé de HAWORTH et coll (30) a permis de recueillir un mannane ayant un poids moléculaire de $5,9 \times 10^4$ mis en évidence par la même technique.

b) Composition qualitative du produit Aa'/1

Après différentes hydrolyses chlorhydriques, les chromatographies sur papier dans les systèmes solvants :

(acide acétique - butanol - eau) et (acétate d'éthyle-pyridine - eau), séparent deux taches bien distinctes, migrant au niveau du glucose et du mannose et révélables par le réactif au nitrate d'argent alcalin et par le réactif au citrate d'aniline.

La pulvérisation sur les chromatogrammes du réactif au para-diméthyl-aminobenzaldéhyde selon le procédé de MONSIGNY (120) révèle une tache au niveau de la glucosamine.

Enfin, la révélation par la ninhydrine montre la présence d'acides aminés. Ces résultats attestent qu'il s'agit d'une glycoprotéine dont la composition est plus complexe que les manno-protéines isolées des parois de Sacc. cerevisiae.

c) Estimation quantitative des composants du produit Aa'/1

La détermination des oses neutres réducteurs a été effectuée, après une hydrolyse chlorhydrique 2M. La cinétique de l'hydrolyse des hexoses en fonction du temps indique que le maximum de libération se situe après 100 minutes, cependant on note que tout le glucose est libéré après 30 minutes. Les hydrolysats chlorhydriques sont purifiés par passage sur résine Dowex 50 w x 8 (25 - 50 mesh) forme acide et Duolite A 102 D forme acétate, selon les conditions préconisées par MONTREUIL et coll (66).

L'effluent, auquel on ajoute les eaux de rinçage, est ensuite lyophilisé puis conservé 48 h. dans un dessiccateur, en présence d'anhydride phosphorique. Nous avons rapporté dans le tableau 29 les principaux résultats de l'analyse des oses neutres du produit Aa'/1.

Tableau 29

Détermination du rapport des oses neutres du produit Aa'/1

Dubois (1)	Park et Johnson (2)	Glucose (3)	Rapport Man /Gluc
3469	-	960	2,61
-	3014	960	2,15

Résultats exprimés en nM d'hexoses par mg de produit lyophilisé par HCl 2 M pendant 100 minutes à 105° C à l'étuve.

- (1) Réaction au phénolsulfurique de détermination des oses totaux de Dubois, résultat exprimé en glucose.
- (2) Réaction au ferricyanure de potassium, résultat exprimé en glucose.
- (3) Dosage du glucose vrai par la glucose-oxydase.

L'évaluation des hexosamines totales est réalisée par la technique d'Elson-Morgan après hydrolyse chlorhydrique (4 M pendant 4 h. à l'étuve à 105° C). 1 mg de produit Aa'/1 renferme 17 nM d'hexosamine.

Pour mieux définir le rapport du mannose par rapport au glucose, nous avons encore appliqué deux techniques chromatographiques, l'une sur papier, l'autre en phase gazeuse.

Le rapport molaire du glucose et du mannose, apprécié selon la méthode de DATE (64) par chromatographie

quantitative sur papier, dans le système solvant : acétate d'éthyle - pyridine - eau, est donné dans le tableau 30. Le résultat en accord avec celui obtenu ci-dessus confirme la très nette prédominance du mannose dans le produit.

Tableau 30

Rapport molaire des hexoses déterminés par la technique de DATE, du produit Aa'/1

	Glucose	Mannose	Rapport mann/glucose
Produit Aa'/1	2045	2909	2,71

- Résultats exprimés en nM/mg de produit.

Après hydrolyse HCl 2 M pendant 100 minutes à 105°C à l'étuve, on dépose l'équivalent de 250 µg de produit.

Moyenne de 3 manipulations.

La chromatographie en phase gazeuse réalisée suivant la technique de ZANETTA (voir Matériels et Méthodes), confirme les résultats précédents.

Les figures 12 et 13 représentent les diagrammes respectifs du produit Aa'/1 après méthanolyse puis trifluoro-acétylation et du mélange II pris comme témoin. Celui-ci contient 100 µg de chaque ose et 50 µg de méso-inositol comme étalon interne.

Tableau 29

Détermination du rapport des oses neutres du produit Aa'/1

Dubois (1)	Park et Johnson (2)	Glucose (3)	Rapport Man /Gluc
3469	-	960	2,61
-	3014	960	2,15

Résultats exprimés en nM d'hexoses par mg de produit lyophilisé par HCl 2 M pendant 100 minutes à 105° C à l'étuve.

- (1) Réaction au phénolsulfurique de détermination des oses totaux de Dubois, résultat exprimé en glucose.
- (2) Réaction au ferricyanure de potassium, résultat exprimé en glucose.
- (3) Dosage du glucose vrai par la glucose-oxydase.

L'évaluation des hexosamines totales est réalisée par la technique d'Elson-Morgan après hydrolyse chlorhydrique (4 M pendant 4 h. à l'étuve à 105° C). 1 mg de produit Aa'/1 renferme 17 nM d'hexosamine.

Pour mieux définir le rapport du mannose par rapport au glucose, nous avons encore appliqué deux techniques chromatographiques, l'une sur papier, l'autre en phase gazeuse.

Le rapport molaire du glucose et du mannose, apprécié selon la méthode de DATE (64) par chromatographie

quantitative sur papier, dans le système solvant : acétate d'éthyle - pyridine - eau, est donné dans le tableau 30. Le résultat en accord avec celui obtenu ci-dessus confirme la très nette prédominance du mannose dans le produit.

Tableau 30

Rapport molaire des hexoses déterminés par la technique de DATE, du produit Aa'/1

	Glucose	Mannose	Rapport mann/glucose
Produit Aa'/1	2045	2909	2,71

- Résultats exprimés en nM/mg de produit.

Après hydrolyse HCl 2 M pendant 100 minutes à 105°C à l'étuve, on dépose l'équivalent de 250 µg de produit.

Moyenne de 3 manipulations.

La chromatographie en phase gazeuse réalisée suivant la technique de ZANETTA (voir Matériels et Méthodes), confirme les résultats précédents.

Les figures 12 et 13 représentent les diagrammes respectifs du produit Aa'/1 après méthanolyse puis trifluoro-acétylation et du mélange II pris comme témoin. Celui-ci contient 100 µg de chaque ose et 50 µg de méso-inositol comme étalon interne.

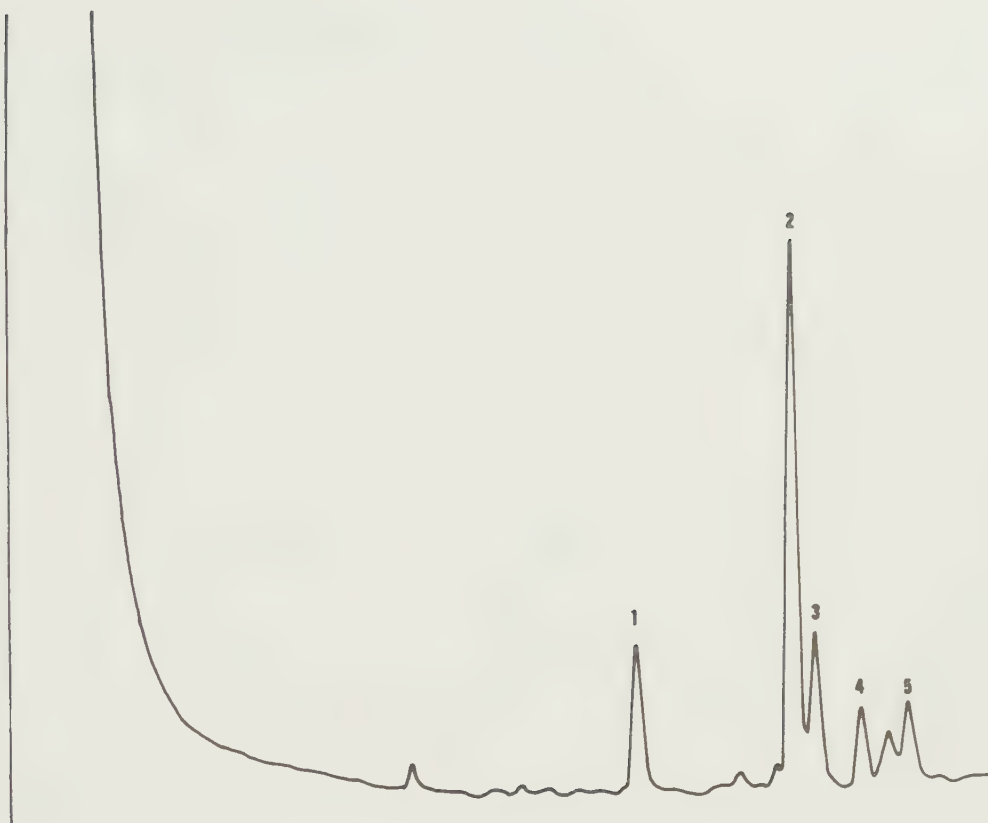


Fig. 12 : Diagramme de la chromatographie en phase gazeuse des oses neutres du produit Aa'/1 après méthanolyse puis trifluoro-acétylation.

Colonne Varaport 30 contenant 5 % de OV-210

Température : 110° à 230° C, 1° C/minute

Débit du gaz vecteur (N₂) 7,5 ml/minute.

1 - Inositol, 2 - Mannose, 3 - glucose, 4 - glucose,
5 - Mannose

- 2 et 5 anomères α et β du mannose
- 3 et 4 anomères α et β du glucose.

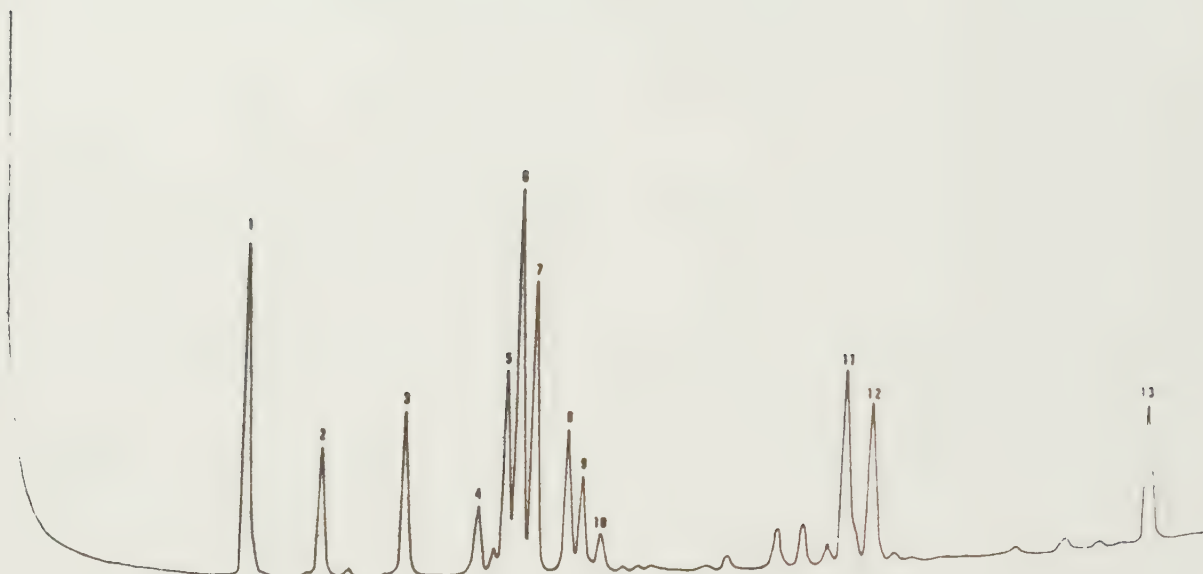


Fig. 13 : Diagramme du mélange II après méthanolyse et Trifluoro-acétylation.

Colonne varaport 30 contenant 5 % de OV 210

Température : 110° à 230° C, 1° C/minute

Débit du gaz vecteur (N₂) 7,5 ml/minute.

1 : fucose, 2 : fucose, 3 : inositol, 4 : galactose,
5 : galactose, 6 : mannose, 7 : glucose, 8 : glucose,
9 : galactose, 10 : mannose, 11 : glucosamine,
12 : galactosamine, 13 : N-acétylneuraminique.

On remarquera que certains oses sont représentés par plusieurs pics, ceci s'explique par la séparation de leurs formes anomères.

Le diagramme du produit Aa'/1 révèle la présence de glucose et de mannose. La quantité du produit injecté étant de 4 μ l soit environ 16 μ g. nous n'avons pas pu mettre en évidence la glucosamine car la teneur en hexosamine est très faible. Cependant en procédant à l'injection d'une quantité supérieure, nous avons mis en évidence un pic au niveau de la glucosamine, mais la présence de pics correspondant aux aminoacides ne nous permet pas de considérer ce résultat comme définitif.

L'exploitation des chromatogrammes est effectuée par rapport à une gamme étalon et en mesurant la hauteur respective de chaque pic ; les hauteurs obtenues pour les isomères des mêmes monosaccharides sont additionnées. Dans le tableau 31, nous représentons les résultats respectifs de la mesure de chaque ose par rapport à la hauteur du témoin interne (méso-inositol).

Nous avons représenté dans la figure 14 une courbe étalon des résultats précédents.

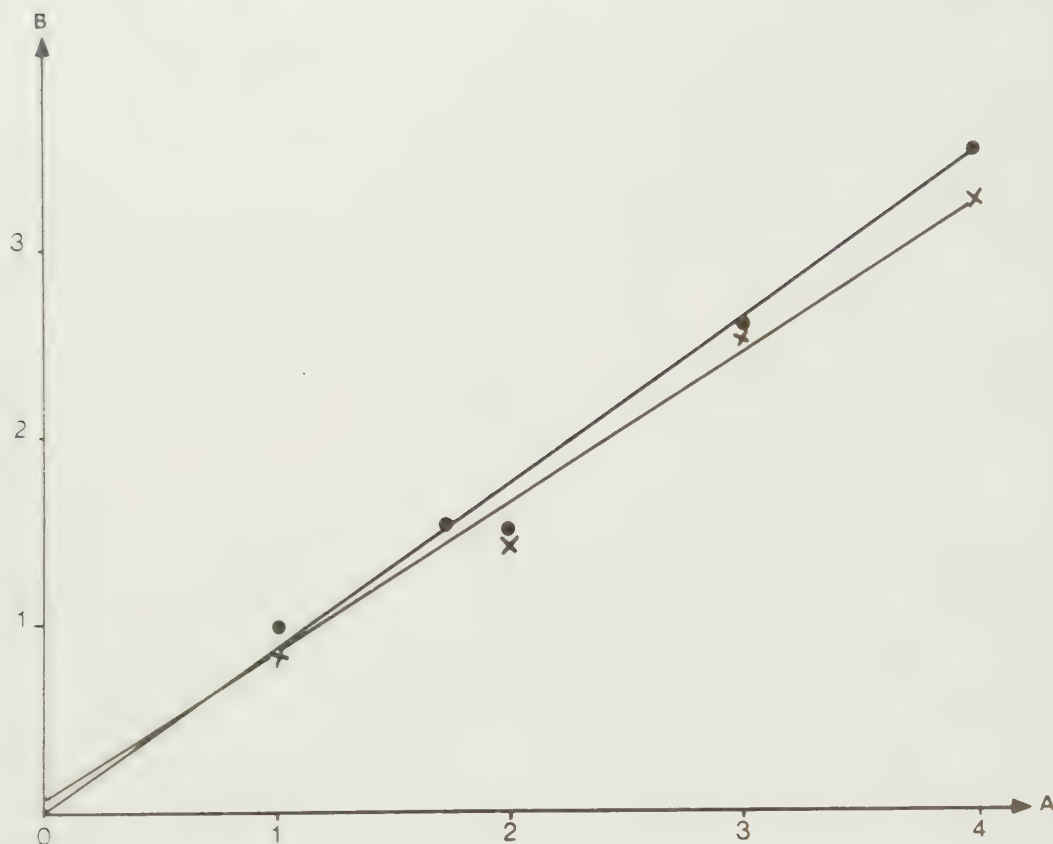


Fig. 14 : Courbe étalon des résultats du tableau 32 correspondant aux diagrammes de chromatographies des solutions témoins.

A = Rapport de la masse de l'ose dans chaque mélange sur la masse du témoin interne

B = Résultat du rapport de la hauteur de chaque pic et hauteur du témoin interne.

Pour chaque ose, on a ainsi 4 points correspondant aux 4 chromatogrammes (mélange I, II, III et IV).

X X X Glucose

• • • Mannose.

L'interprétation des calculs du diagramme de la chromatographie du produit Aa'/1 permet d'estimer la teneur en glucose et mannose ainsi que leur rapport molaire. Le tableau 32 rassemble ces résultats.

Résultats de la mesure respective des pics du mannose et du glucose après chromatographie en phase gazeuse selon ZANETTA (65).

	Mélange I			Mélange II			Mélange III			Mélange IV		
	Gluc.	Mann.	Méso-ino.	Gluc.	Mann.	Méso-ino.	Gluc.	Mann.	Méso-ino.	Gluc.	Mann.	Méso-ino.
Hauteur des pics	7,6	7,5	8,9	8	8	5,6	17,1	16,2	6,4	10,3	9,8	3
Rapport*	0,84	0,84		1,42	1,42		2,67	2,53		3,43	3,26	

Mélange I = 90 µg d'oses (mélange de chaque ose) + 50 µg méso-inositol (soit 50/50 = 1).
Mélange II = 100 µg d'oses (mélange de chaque ose) + 50 µg méso-inositol (soit 100/50 = 2).
Mélange III = 150 µg mélange + 50 µg méso-inositol.
Mélange IV = 200 µg mélange + 50 µg méso-inositol.

Rapport*: quotient de la hauteur de chaque pic et de la hauteur du pic témoin correspondant à chaque chromatogramme.

Tableau 32

Rapport et teneur en mannose et glucose.

	glucose	mannose	Rapport
Aa'/1	1300	3650	2,80

- Résultats exprimés en nM/mg de produit.

Ces résultats confirment les données précédentes déjà démontrées par chromatographie sur papier et par dosages colorimétriques. La moyenne des résultats des trois techniques donne un rapport de mannose/glucose = 2,70.

- Estimation des aminoacides dans le produit Aa'/1

Le dosage et l'identification des acides aminés ont été effectués selon le procédé général de PIEZ et MORRIS à l'auto-analyseur Technicon. Nous avons rapporté dans le tableau 33 les résultats obtenus après hydrolyse chlorhydrique 6 M pendant 15 heures à l'étuve à 105° C.

L'examen de ce tableau montre que le produit est riche en acide aspartique, acide glutamique, sérine, glycine et alanine, ce qui confère à ce produit une dominante anionique.

Tableau 33

Teneur en acides aminés dans le produit Aa'/1.

Acides aminés	nM/mg	Rapport/lysine
Acide aspartique	14	2,8
Thréonine	8	1,6
Sérine	20	4
Acide glutamique	12	2,56
Proline	9	1,8
Glycine	20	4,1
Alanine	29	5,9
Valine	4	0,98
Cystine	traces	
Méthionine	1	0,2
Isoleucine	4	0,8
Leucine	10	2
Tyrosine	4	0,8
Phénylalanine	4	0,9
Ornithine	1	0,26
Lysine	5	1
Histidine	3	0,7
Arginine	4	0,8

- Résultats exprimés en nM/mg de produit.

Rapport exprimé en fonction de la teneur en lysine.

D'après ce tableau, la masse moléculaire minimum est de 17.000, à dominance anionique.

Le traitement du produit Aa'/1 par la soude 0,5 N pendant 4 à 5 jours n'entraîne pas de clivage entre la copule protéique et la copule glucidique. Ce résultat est en faveur d'une liaison de type amide stable vis-à-vis de la soude entre les deux parties. En effet, on sait que dans le cas de liaisons O-glycosidiques, la soude provoque une " β élimination" qui conduit à la libération de la partie protéique. De plus, dans cette dernière, les aminoacides alcooliques, sérine ou thréonine, impliqués dans la liaison O-glycosidique, sont transformés. Or l'analyse de la copule protéique, après traitement du produit Aa'/1 par la soude, ne montre pas de modification dans la teneur en aminoacides.

d) Méthylation des oses neutres du produit Aa'/1

Toute étude de polysaccharide implique la recherche la plus complète possible des types de liaisons existants entre les monomères glucidiques. La méthylation permet d'aboutir à une telle connaissance, elle représente le procédé de choix pour déterminer la structure d'un glycanne.

Cette méthode, qui s'effectue en deux étapes, permet la détermination des liaisons entre les monomères, par l'identification des dérivés méthylés obtenus.

La première étape est une méthylation totale de tous les hydroxyles libres des motifs du polymère. Puis ce polymère perméthylé est clivé en ses éléments simples par hydrolyse ou méthanolyse. Les monomères non totalement méthylés sont identifiés par chromatographie en phase gazeuse ou par chromatographie sur papier, la position dans le produit de départ des hydroxyles libres signale la liaison osidique, car celle-ci les a protégés de la méthylation.

Dans le cas du produit Aa'/1, nous avons appliqué la méthode préconisée par HAKAMORI (71) et modifiée par FOURNET (72). Le produit Aa'/1 est parfaitement dissous dans le diméthyl-sulfoxyde (DMSO) et trois cycles successifs de

méthylations sont effectués. Ensuite, le produit est filtré sur Sephadex LH 20, afin de le débarrasser de tout reste de DMSO (voir Matériels et Méthodes). Nous soumettons alors le produit méthylé à une hydrolyse énergique en vue de libérer tous les monomères osidiques.

Cette hydrolyse qui s'effectue avec l'acide chlorhydrique 4 M pendant 4 h au bain-marie bouillant, libère les hexosamines et les oses méthylés sans les dégrader (129). Le résultat de l'hydrolyse est soumis à une électrophorèse préparative sur papier Whatman 3 MM à pH 3,9 (tampon de Michl) sous un courant de 12V/cm pendant 4 heures (Fig. 15).

Des témoins de glucosamine et d'oses neutres permettent de localiser sur le papier, après révélation, la zone des oses neutres (z n) et la zone des osamines (z b). Les deux zones sont respectivement éluées selon la méthode de DENT (74). Après évaporation à siccité, les éluats sont conservés une nuit en dessiccateur sous P_2O_5 .

La fraction correspondante à la zone basique " Zb " est triméthylsililée, puis analysée par chromatographie en phase gazeuse, comme indiqué dans Matériels et Méthodes.

L'interprétation des chromatogrammes est délicate, du fait de la contamination par les aminoacides ; cependant on peut noter la présence d'un pic correspondant à un dérivé triméthylsilylé de la 3-6di-O-méthyl-N-méthyl glucosamine.

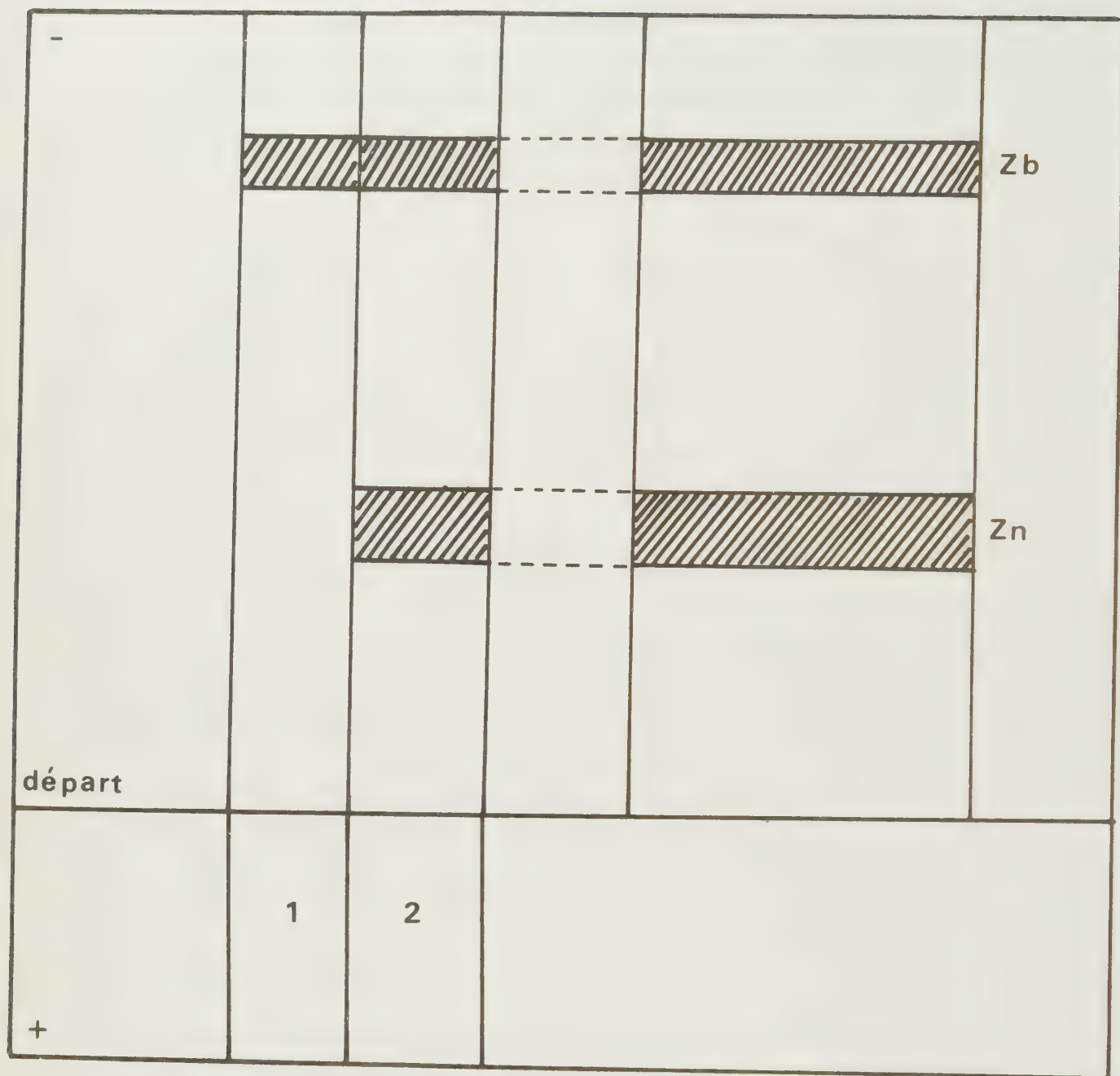


Fig. 15 : Electrophorèse préparative de l'hydrolysât du produit Aa¹/1 perméthylé. Papier Whatman 3 MM, tampon Michl pH 3,9 12 V/cm.

Bande 1 : révélation à l'oxalate d'aniline

Bande 2 : révélation à la ninhydrine

Zn = zone neutre contenant la fraction des oses neutres.

Zb = zone basique contenant la fraction des osamines.

La fraction correspondant à la zone neutre Zn, après élution et méthylglycosilation est également analysée par chromatographie en phase gazeuse. Nous avons effectué nos analyses selon le mode opératoire décrit dans Matériels et Méthodes.

La figure 16 nous montre le diagramme obtenu après injection de 1 μ l de la fraction neutre (résidu repris par 300 μ l de méthanol).

L'interprétation des chromatogrammes est réalisée par rapport à des témoins de laminarine et d'amidon soluble qui ont été méthylés en parallèle. Les éthers méthylés du mannose nous ont été aimablement fournis par FOURNET (72).

Nous rassemblons dans les figures 17, 18 et 19 les diagrammes respectifs de l'amidon soluble, de la laminarine et du mannose après méthylation et méthylglycosylation.

Sur le chromatogramme du produit Aa'/1 méthylé, on peut observer des pics correspondant successivement aux dérivés suivants :

- 2, 3, 4, 6 O-tétraméthyl-glucose (méthylglucoside) ou tétraméthyl-mannose.
- 2, 3, 6 O-triméthylglucose
- 2, 4, 6 O-triméthylmannose
- 2, 3, 6 O-triméthylmannose
- 2, 4, 0-diméthylmannose.

Cependant la chromatographie en phase gazeuse dans les conditions décrites ci-dessus ne permet pas de séparer le tétraméthyl-glucose du tétraméthyl-mannose, c'est pourquoi il est nécessaire de procéder à une chromatographie sur papier (*) des éthers méthyliques, avec le système solvant : n-octane, isopropanol - solution d'ammoniaque à 10 % (50 - 25 - 2 v/v/v). On obtient dans ces conditions une excellente séparation des éthers tétraméthylés du glucose et du mannose (130).

Les résultats obtenus indiquent la présence du tétraméthylglucose dans le produit Aa'/1 méthylé, ce qui est en faveur d'un motif glucose terminal dans les chaînes polysaccharidiques de ce produit.

L'examen de l'ensemble de ces données atteste que le glucose est impliqué dans les liaisons du type $1 \longrightarrow 4$, tandis que le mannose est impliqué dans des liaisons en $1 \longrightarrow 3$, $1 \longrightarrow 4$ et $1, 3, 6$.

De plus, il n'y a pas, en quantité décelable, de mannose terminal, alors que nous caractérisons du glucose tétraméthylé ; ce qui donne une indication précise sur la nature des terminaisons des chaînes polyosidiques du produit.

Ces résultats conduisent à proposer que le produit Aa'/1 possède une chaîne de base formée de mannose ou mannose-glucose, sur laquelle sont branchées, à partir des résidus mannose, des chaînes latérales osidiques terminées par un glucose.

Nous avons complété notre étude du produit par l'oxydation périodique qui peut aussi fournir des informations structurales.

(*) Nous tenons à exprimer nos remerciements à M. FOURNET du laboratoire de Chimie Biologique de la faculté de Science de Lille, pour avoir participé à cette manipulation.

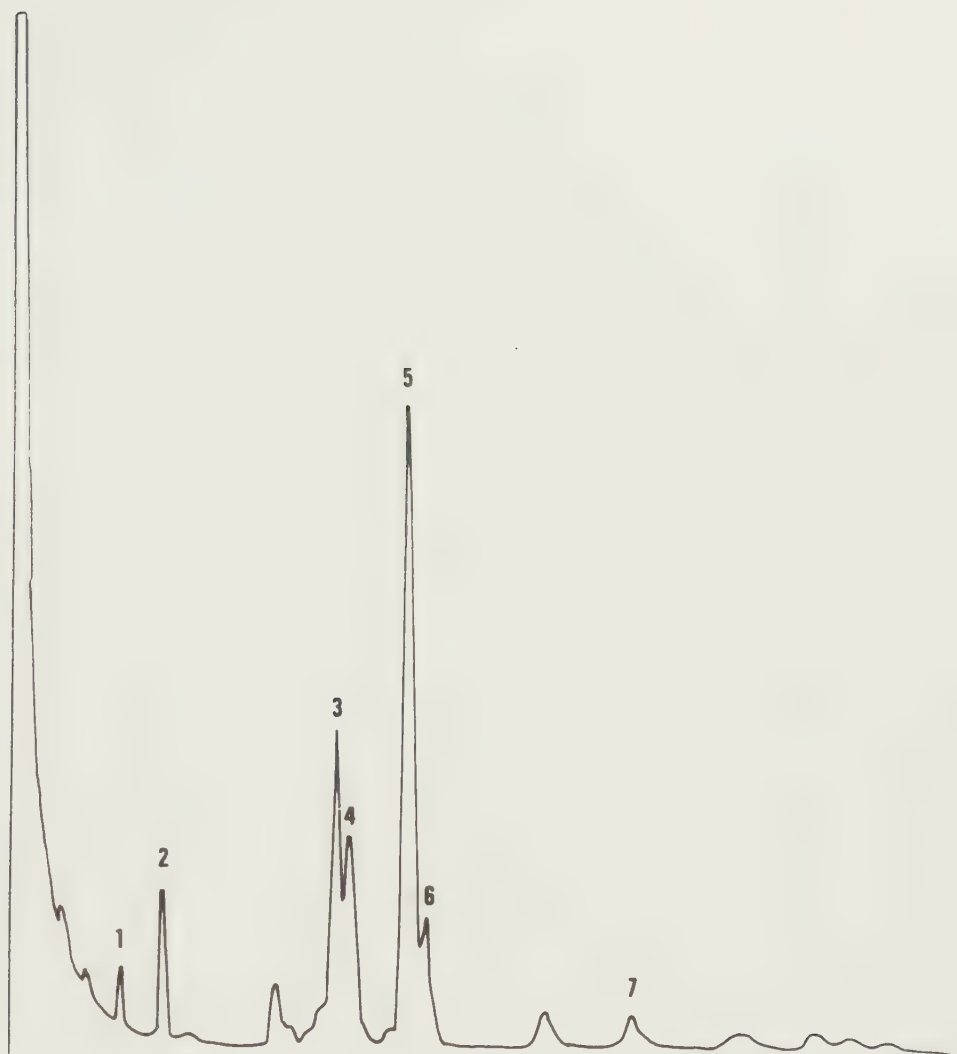


Fig. 16 : Diagramme de la chromatographie en phase gazeuse du produit Aa' / 1 après méthylation.

Colonne de chromosorb W - AW HMDS à 3 % de carbowax 6000

Température : 150 à 190° C à raison de 1° C/minute.

1 : 2, 3, 4, 6 O-tétraméthyl-glucose

2 : 2, 3, 4, 6 O-tétraméthyl-glucose

3 : 2, 3, 6 O-triméthylglucose

4 : 2, 4, 6 O-triméthylmannose

5 : 2, 3, 6 O-triméthylglucose

6 : 2, 3, 6 O-triméthylmannose

7 : 2, 4 O-diméthylmannose

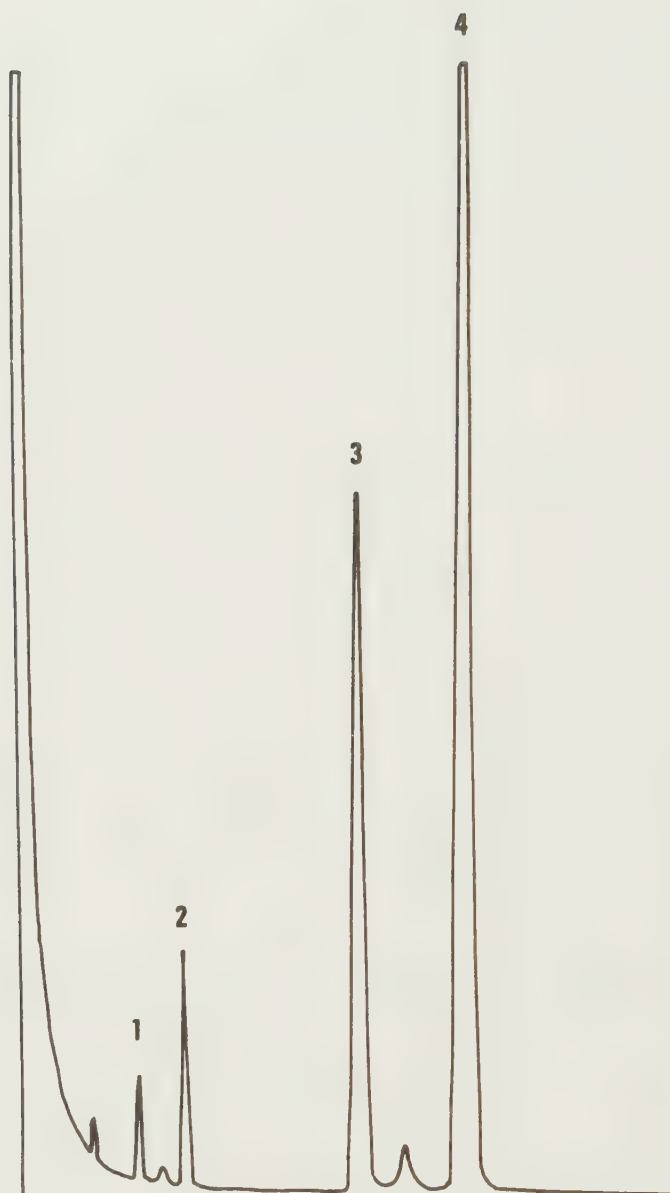


Fig. 17 : Diagramme de chromatographie en phase gazeuse de
l'amidon soluble après méthylation.

Température 150° à 190° C, 1°/minute.

Colonne de chromosorb W AW HMDS à 3 % de Carbowax 6000

1 : 2, 3, 4, 6 O-tétraméthylglucose

2 : 2, 3, 4, 6 O-tétraméthylglucose

3 : 2, 3, 6 O-triméthylglucose

4 : 2, 2, 6 O-triméthylglucose.



Fig. 18 : Diagramme de chromatographie en phase gazeuse de la laminarine après méthylation.

Colonne de chromosorb W. AW. HMDS à 3 % de carbowax 6000

1 : 2, 3, 4, 6 O-tétraméthylglucose

2 : 2, 3, 4, 6 O-tétraméthylglucose

3 : 2, 4, 6 O-triméthylglucose

4 : 2, 4, 6 O-triméthylglucose.

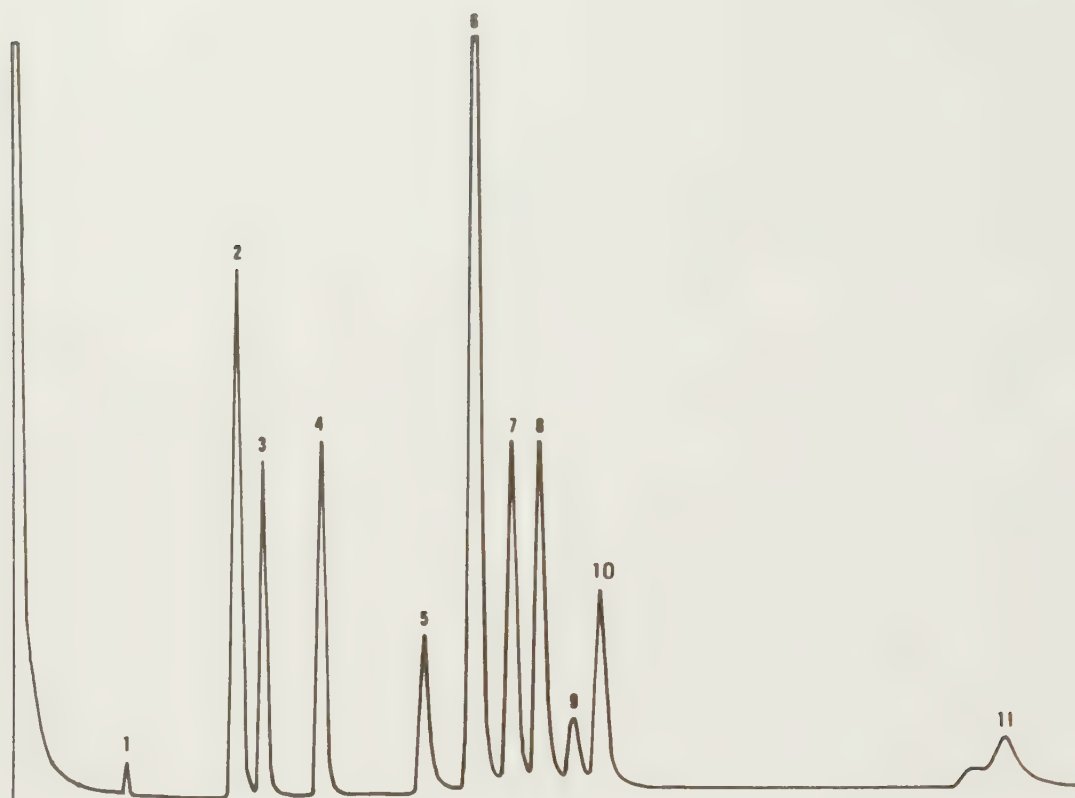


Fig. 19 : Diagramme des éthers méthyliques du mannose
Température programmée de 150° C à 190° C, 1° C/mi-
nute
Appareil Aerograph (2100)
Colonne de chromosorb w.Aw HMDS à 3 % de
Carbowax 6000

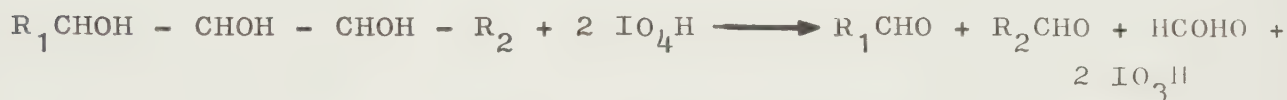
- 1 : 2, 3, 4, 6 O-tétraméthylmannose
- 2 : 2, 3, 4 et 3, 4, 6 O-tétraméthylmannose
- 3 : 2, 4, 6 O-triméthylmannose
- 4 : 2, 3, 6 O-triméthylmannose
- 5 : 3, 4 O-diméthylmannose
- 6 : 2, 4 O-diméthylmannose
- 7 : 3, 6 O-diméthylmannose
- 8 : 2, 6 O-diméthylmannose
- 9 : 4, 6 O diméthylmannose
- 10 : 2, 3 O-diméthylmannose
- 11 : non identifié.

e) Oxydation périodique du produit Aa' / 1

L'acide périodique oxyde spécifiquement les α -glycols (et les α -amino-alcools) en coupant les liaisons C-C et en donnant naissance à des fonctions aldéhydiques aptes à réagir par leur caractère réducteur.



Dans certains cas, de l'acide formique et du formaldéhyde sont libérés : si la molécule oxydée est un triol vicinal il y a libération d'une molécule d'acide formique.



et, si les molécules portent une fonction alcool primaire, il se forme une molécule de formaldéhyde.



La consommation d'acide périodique permet de déterminer globalement le nombre d' α glycols ou α amino-alcools libres. L'oxydation périodique a été effectuée suivant la technique préconisée par GLICK (76) (Voir Matériels et Méthodes).

La quantité d'acide périodique consommée, liée au nombre d' α -glycols libres présents dans la molécule, est déterminée par spectrométrie dans l'ultra-violet. L'absorption du périodate à 310 nm est importante, alors que les produits formés, iodates et aldéhydes, n'absorbent pas à cette longueur d'onde. Après 8 h. de contact dans l'obscurité et à une température comprise entre 0 et 4° C, l'absorbance est stabilisée. Le mélange est alors déminéralisé par un passage sur colonnes (2 x 20) d'échangeurs de cations (Dowex 50 x 8, 25 à 30 mesh forme acide) et d'échangeurs d'anions (Duolite A-140 forme acétate). La solution effluente est ensuite évaporée à siccité sous pression réduite.

Le produit Aa'/1 ainsi oxydé par le périodate contient toujours la même quantité d'hexosamines, soit 17 nmoles/mg de produit ; cette hexosamine est donc engagée dans des liaisons telles que l'oxydation périodique n'est pas possible.

L'identification et le dosage des aminoacides révèlent la présence de la gamme usuelle des aminoacides. L'hydrolyse du composé après oxydation périodique révèle un rapport glucose/mannose de 0,305 ; c'est-à-dire légèrement inférieur à celui trouvé avant oxydation, soit glucose/mannose de 0,375. Ceci conduit à penser que l'oxydation du glucose se produit préférentiellement à celle du mannose, bien que les monomères 1 $\longrightarrow$ 4 soient théoriquement tous vulnérables à l'oxydation périodique.

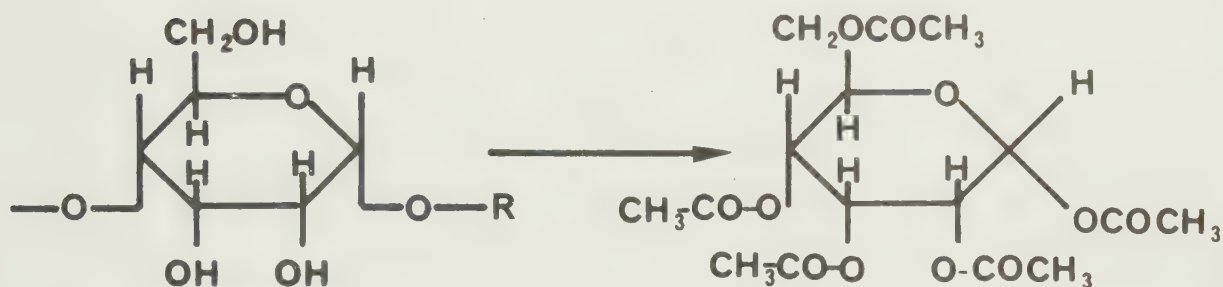
Nous pouvons déduire des résultats obtenus pour cette technique que les oses de Aa'/1 oxydables théoriquement ne sont pas tous coupés, pour des raisons probablement conformationnelles, mais que les molécules de glucose le sont nettement plus que celles de mannose ; ce qui est également en faveur de leur localisation terminale ; en effet, une oxydation peut être bloquée pour un motif ramifié ou un mannose 1 $\longrightarrow$ 3.

Nous n'avons pas poursuivi cette étude par l'oxydation périodique car, comme l'a signalé MONTREUIL (131), cette technique n'apporte que des renseignements fragmentaires et consomme beaucoup de produit.

f) Acétolyse du produit Aa'/1

Une autre méthode d'étude des polysaccharides consiste à les traiter par des mélanges hydrolysants doux. La technique de l'acétolyse est utilisée depuis 1879 date à laquelle FRANCHIMONT effectua des recherches sur la cellulose. Le principe de l'acétolyse s'appuie sur la réaction

suiivante : l'acide acétique, en milieu rigoureusement anhydre, coupe les liaisons glycosidiques en libérant des acétyl-glycosides ; son action porte exclusivement sur les groupes hydroxyles libres qui seuls sont acétylés.



2, 3, 4, 6 tétraacétyl
-O-acétyl-glucoside.

Nous avons appliqué la technique préconisée par BAYARD (132). Un échantillon de 10 mg de produit Aa'/1 est dissous dans 0,50 ml d'un mélange acide acétique-anhydride acétique-acide sulfurique concentré (10:10:1, v/v/v). La réaction est effectuée à 20° C pendant 2 jours. Le mélange est versé sur 25 g de glace et le pH est ajusté à 4,5 avec du bicarbonate de sodium en poudre. On effectue ensuite une extraction par le chloroforme qui doit permettre de récupérer dans la phase organique les oses acétylés. La phase aqueuse restante est concentrée puis passée sur résine Dowex 50 x 2) ; l'effluent contient des oses neutres partiellement acétolysés et le lavage de la résine par une solution d'ammoniaque à 5 % v/v permet d'éluer la fraction glycopeptidique acétylée.

Pour le produit Aa'/1, l'extraction par le chloroforme, après acétolyse, ne permet de séparer aucun composé, ce qui montre qu'il ne s'est pas formé d'ose ou d'oside peracétylé.

Le passage de l'acétolysat sur colonne Dowex (50 x 2) fournit une fraction partiellement acétolysée, non

retenue sur la colonne. Après désacétylation de cette fraction par la soude 0,5 N pendant 18 h. à 4° C, le mélange est déminéralisé par passage sur colonne Dowex (50 x 2) (forme acide H⁺) puis lyophilisé. L'hydrolyse chlorhydrique 2 N pendant 100 minutes révèle la présence de glucose et de mannose.

La fraction éluee de la colonne par l'ammoniaque constitue 40 % du produit Aa'/1 de départ. Après chromatographie sur papier Whatman 3 M dans le système solvant : n-butanol - acide acétique - eau (4 - 1 - 5) pendant 3 jours (méthode descendante), la révélation latérale permet de mettre en évidence une fraction bien distincte dont l'élution est réalisée selon la méthode de DENT (74).

L'analyse chromatographique sur papier de cette fraction, après hydrolyse chlorhydrique 2 M pendant 2 h 30, nous a permis d'obtenir des renseignements complémentaires sur la structure de cette glycoprotéine Aa'/1. En effet, cette fraction est constituée de glucose et de glucosamine, et la révélation des chromatogrammes par la ninhydrine (0,5 % dans le butanol) permet de mettre en évidence une tache au niveau de l'acide aspartique.

Les quantités limitées de produit dont nous disposons ne nous ont permis d'effectuer sur cette fraction qu'une étude succincte. Toutefois, ce dernier résultat vient confirmer des résultats obtenus par hydrolyse formique des parois. En effet, après hydrolyse formique (chapitre II), nous avons séparé par électrophorèse sur papier un certain nombre de glycopeptides et parmi ceux-ci un produit contenant du glucose, de la glucosamine ainsi que des aminoacides (133). Ces deux données, obtenues par des voies différentes, plaident en faveur de l'existence d'un enchaînement glucose - glucosamine - aminoacide. D'une façon générale, bien que les traitements chimiques soient parfaitement reproductibles et conduisent à des renseignements précieux, leur action est énergique et sans nuances ; ils ne permettent pas d'exclure certaines imprécisions et empêchent des conclusions définitives et sûres. C'est ce qui nous a amené à l'utilisation de systèmes de dégradation par voie enzymatique qui ne souffrent pas de ces inconvénients.

g) Action des systèmes enzymatiques sur le produit Aa'/1

1) Hydrolyse pronasique

La pronase est un enzyme protéolytique, elle permet d'éliminer la majeure partie de la copule protéique.

Pour traiter le produit Aa'/1 par cette enzyme, nous avons appliqué le mode opératoire préconisé par MONSIGNY et coll (134). Pour cela, 30 mg de produit sont dissous dans 10 ml de tampon acétate de calcium 0,01 M, on ajoute ensuite 2 mg de pronase (Calbiochem). L'hydrolyse est effectuée à pH 8 et à 37° C sous agitation pendant 48 h. en présence de toluène (II gouttes). Le pH est maintenu constant par addition de soude 0,1 N. En fin d'incubation, l'hydrolysat pronasique est ajusté à pH 4,5 par addition d'acide acétique, puis concentré à 2 ml environ. Un volume de 20 ml d'éthanol absolu est alors ajouté et le tout est laissé au repos à + 4° C pendant une nuit. Le précipité qui se forme est

recueilli par centrifugation et le mode opératoire est recommencé. Après 3 cycles successifs de traitement par la pronase, le précipité final est dissous dans 3 ml d'eau distillée puis filtré sur gel Sephadex G 150 (Fig. 19). Le repérage des constituants dans l'effluent est réalisé par un dosage des oses totaux au phénol sulfurique de DUBOIS (67).

Les fractions sont réunies et lyophilisées, nous avons rassemblé dans le tableau 34 les principaux résultats se rapportant au produit Aa'/1 hydrolysé par la pronase.

La recherche et l'identification des aminoacides ont été effectuées à l'autoanalyseur Technicon, après hydrolyse chlorhydrique 5,6 M pendant 18 h. à 110° C en tube scellé.

Les résultats montrent la disparition de presque tous les aminoacides. En effet, seuls 3 pics peuvent être caractérisés, un pic important correspondant à l'acide aspartique et 2 pics très faibles correspondants à la glycine et à l'alanine. La pronase a donc éliminé la majeure partie des aminoacides tout en respectant les molécules d'acide aspartique qui restent fermement liées au glycanne.

Les résultats rapportés dans le tableau 34 démontrent aux erreurs d'expériences près, que le rapport Mannose/glucose demeure stable, et que les valeurs de la glucosamine et de l'acide aspartique sont très proches l'une de l'autre.

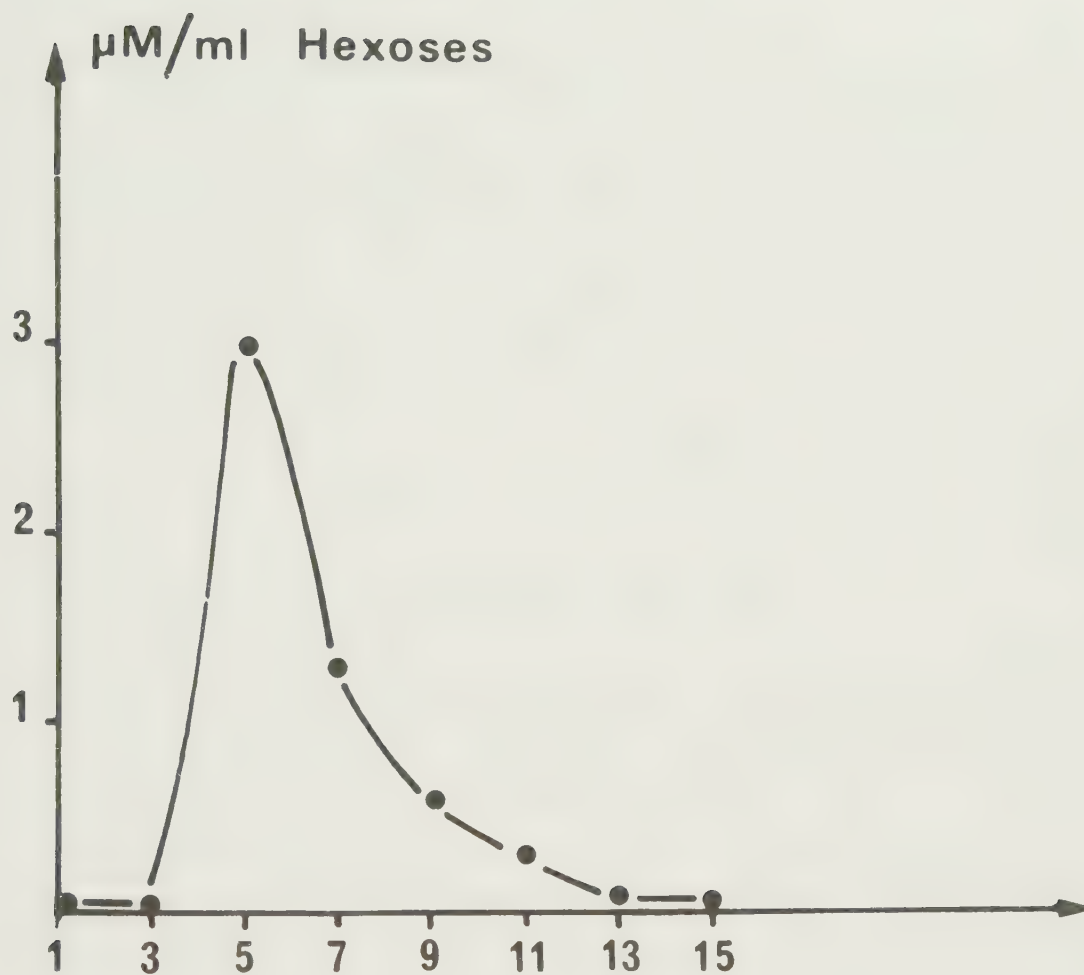


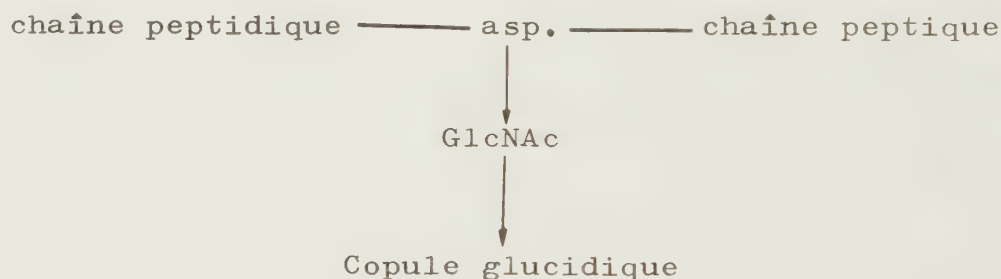
Fig. 19 : Diagramme d'élution du produit Aa'/1 après traitement par la pronase.
Colonne Sephadex G 150
Volume de la colonne 60 ml
Fraction de 6 ml
Débit 0,24 ml/minute.

Tableau 34

	glucose vrai	Dubois	Rapport	hexosamine	ac. asp.
Aa'/1	1308	4800	2,65	14	19

- Résultats exprimés en nM/mg de produit lyophilisé après traitement par la pronase.
- Dubois : oses totaux exprimés en glucose.

Compte tenu des renseignements déjà recueillis précédemment, il apparaît évident que dans le produit Aa'/1 la glucosamine joue un rôle de lien entre la copule glucidique et la copule peptidique suivant le schéma suivant :



2) Traitement du produit Aa'/1 par l' α et la glucosidase

Les liaisons entre les monomères glucidiques entrant dans la composition des polysaccharides peuvent être soit du type α ou β . Dans certains cas la spectrographie infra-rouge permet de discerner la configuration α ou β d'un polysaccharide, mais les résultats sont assez décevants. Des spectres infra-rouges effectués sur le produit Aa'/1 n'ont pas permis d'obtenir des données concluantes quant à la configuration α ou β . Cela tient peut être au fait que ces deux types de configuration existent dans la molécule. Nous

avons alors testé sur le produit Aa'/1 l'action de l' α et de la β -glucosidase. La première enzyme ne libère pas de glucose, même après un temps d'incubation de 24 h à 37° C. La β -glucosidase libère 95 nM de glucose par mg de produit soit 10 à 12 % de glucose total. Bien que ce résultat soit assez faible, il plaise en faveur d'une configuration β du glucose dans le produit. Le glucose ainsi libéré peut davantage correspondre à des résidus de glucose terminaux facilement accessibles et hydrolysables par cette exoglucosidase.

En résumé, le produit Aa'/1 est une glycoprotéine de PM 64.000. La copule glucidique qui représente environ 70 % de la molécule est un hétéroglycane constitué de mannose, glucose et glucosamine.

Pour la structure de cet hétéroglycane, l'ensemble des données permet de limiter les propositions à un petit nombre de possibilités dont nous avons retenu le type suivant.

L'armature de base de cet hétéroglycane est formée de maillons mannose dont les liaisons sont tantôt 1 $\rightarrow$ 4, tantôt 1 $\rightarrow$ 3. Nous n'avons pas de résultats permettant d'affirmer cette alternance, mais la structure de cette chaîne de mannane peut correspondre à celle décrite par GORIN et coll (127) pour les mannanes extracellulaires secrétées par différentes levures Rhodotorula dont Rh. rubra, c'est-à-dire possédant une alternance de maillons liés en 1 $\rightarrow$ 3 et 1 $\rightarrow$ 4.

Sur cette chaîne de base, se greffe un certain nombre de ramifications en position 6 sur des résidus mannoses. liés en 1 $\rightarrow$ 3. Ces chaînes latérales sont constituées d'éléments β -glucoses liés en 1 $\rightarrow$ 4 ; certaines de ces chaînes latérales se terminent soit par un reste glucose non réducteur, soit par un système de liaison à la protéine caractérisé par trois éléments ordonnés glucose - glucosamine - acide aspartique. Cette liaison étant du type aspartyl β -D N-acétylglucosamine stable aux alcalis. La faible quantité

de glucosamine et d'acide aspartique trouvée indique que les points d'attache sont en nombre restreint.

Nous avons rassemblé l'ensemble des résultats dans un tableau (35) afin d'établir un bilan permettant de définir certaines caractéristiques générales de cette glyccoprotéine.

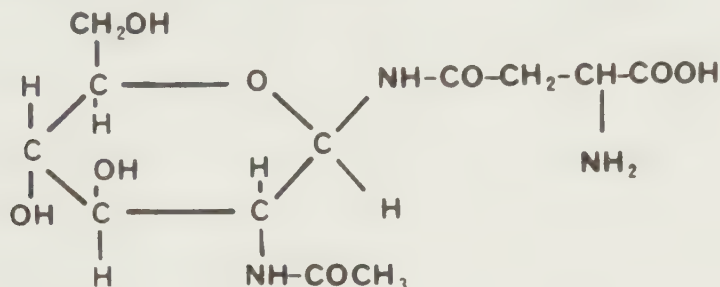
Tableau 35

Données sur la structure du glycopeptide Aa¹/1

I - Masse moléculaire globale	64.000
Masse moléculaire approchée de la copule protéique	17.000
Masse moléculaire approchée de la copule glucidique	47.000

II - Liaison copule protéique - copule glucidique

Liaison du type aspartyl β -D N-acétylglucosamine



III - Oxydation périodique

Oxydation partielle du glucose : pas de destruction de la glucosamine donc liaison en 4 ou 3.

IV - Méthylation

glucose 1 $\longrightarrow$ 4 et glucose terminal

Mannose 1 $\longrightarrow$ 4, 1 $\longrightarrow$ 3 et mannose 1 $\longrightarrow$ 3 substitué en 6, donc éventuellement motifs alternés (mann. 1 $\longrightarrow$ 3 et 1 $\longrightarrow$ 4), avec des ramifications en 6.

V - Acétolyse

Il n'y a pas d'acétolyse complète après 2 jours, et on met en évidence un reste



donc liaison de la copule protéique à la copule glucidique par un reste glucosamine

VI - Action de la pronase

Elimination de la majeure partie des aminoacides, il reste un résidu acide aspartique correspondant à un résidu glucosamine.

VII - β - glucosidase

Réaction positive donc configuration du glucose.

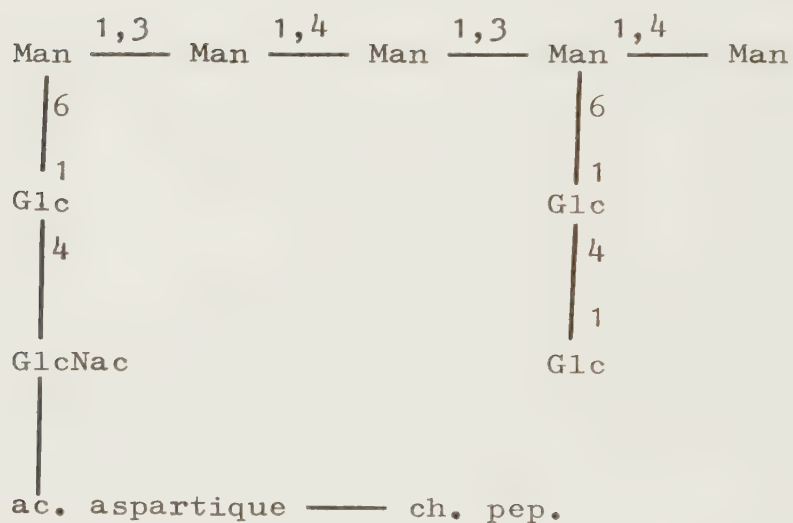
Si on admet que l'enchaînement des motifs mannoses correspond au mannane :



excrétée par Rh. glutinis d'après Gorin et Coll (127)

L'ensemble des indications concernant la structure du produit Aa'/1 peuvent être représentées par le schéma suivant :

Schéma de la structure du produit Aa'/1



Pour que cette structure soit plus surement établie, différents points doivent encore être déterminés, en particulier l'alternance des liaisons $1 \longrightarrow 3$ et $1 \longrightarrow 4$ dans la chaîne de base et la liaison $1 \longrightarrow 6$ du glucose des chaînes latérales sur un mannose de la chaîne de base.

De telles structures peuvent être déterminées en analysant les multiples oligosides obtenus par des hydrolyses partielles du produit natif. Des essais par hydrolyse formique et par acétolyse ont été réalisés dans ce sens, mais jusqu'à présent ils n'ont pas permis d'obtenir des résultats nets.

Etude des sous-fractions Aa'/2 et Aa'/3

La filtration du produit A sur colonne Sephadex G50 et G 25 sépare deux fractions Aa' et Ab'. Une seconde filtration de la fraction Aa' sur colonne Sephadex G 100 - G 75 sépare trois sous-fractions Aa'/1, Aa'/2 et Aa'/3 (voir fig. 10 page 23).

Bien que les sous-fractions Aa'/2 et Aa'/3 recueillies soient en faible quantité par rapport à la fraction Aa'/1, nous avons tenu à les étudier, afin d'explorer au maximum la structure de la paroi de la levure Rhodotorula après culture sur milieu V.

Les deux sous-fractions sont homogènes à l'électrophorèse, en tampon pH 3,8 elles migrent vers l'anode. La révélation des électrophorégrammes par le nitrate d'argent alcalin et le chlore benzidine indique que les produits de ces fractions sont de nature glycopeptidique.

La fraction Aa'1/2 contient 61 % de glucides. Cette copule glucidique est constituée de glucose et mannose qui se trouvent dans un rapport molaire de Man/Glc = 2,5 (tableau 36). On ne peut déceler la présence de glucosamine.

La fraction Aa'1/3 ne contient que 15 % de copule glucidique. Celle-ci est composée en quantité équimolaire de glucose et mannose. Il n'y a pas de glucosamine décelable.

Quant à la copule peptidique, elle est très riche en acides dicarboxyliques, ce qui lui confère un caractère anionique marqué.

Tableau 36

Teneurs en glucose, mannose des sous-fractions Aa'1/2 et Aa'1/3

	Dubois	Park et Johnson	Glucose vrai	Rapport Man/Gluc	Glucosam.
Aa'1/2	3800	3000	960	2,5	néant
Aa'1/3	900	800	400	1	néant

- Résultats exprimés en nM:mg de produit après hydrolyse chlorhydrique 2 M, 2h à l'étuve (110°).

L'absence de glucosamine dans les 2 fractions pose le problème du mode de liaison entre les deux types de copule. Nous devons exclure la possibilité de liaison du type N- β aspartyl. Le type de liaison de la copule protéique à la copule glucidique dans ces deux produits reste à déterminer.

L'origine de ces produits Aa'1/2 et Aa'1/3 est difficile à préciser, il s'agit, comme pour le produit Ab' de produits libérés par action de l'éthylène diamine sur les parois.

Tableau 37

Teneur en aminoacides des deux sous-fractions Aa'/2 et Aa'/3

Ac.aminé	Aa'/2	Rapport/lysine	Aa'/3	Rapport lysine
Ac. aspartique	9	3	60	30
Thréonine	7	2,3	37	12,3
Sérine	12	4	38	12,6
Ac.glutamique	6	2	32	16
Proline	traces	traces	20	10
Glycine	14	4,6	108	54
Alanine	12	4	58	29
Cystéine	-	-	-	-
Valine	15	5	28	14
Méthionine	-	-	-	-
Isoleucine	2	0,11	11	5,5
Leucine	-	1,3	26	13
Tyrosine	2	0,11	4	2
Phénylalanine	2	0,11	9	4,5
Ornithine	1	0,3	traces	
Lysine	3	1	2	1
Histidine	traces	-	-	-
Arginine	1	0,3	-	-

- Résultats exprimés en nM/mg de produit sec après hydrolyse HCl 5,6 M, 15 à 18 h. à 105° C à l'étuve.

Rapports exprimés en fonction de la teneur lysine.

En conclusion, ce chapitre apporte une contribution à la connaissance d'ensembles polymériques solubles, isolables à partir des parois, par traitement nucléophile à l'éthylène-diamine.

Ces macromolécules sont des glycoprotéines, sans doute éléments de structure importants, doués d'une certaine individualité, qui se séparent de l'ensemble à des points spécifiques. Ces fractions, d'importance pondérale minoritaire (moins de 10 %), semblent se retrouver dans diverses levures, et jouent peut-être un rôle dans l'édification ou la fonctionnalisation enzymatique des parois.

C O N C L U S I O N

Les levures Rhodotorula, très largement répandues dans la nature, se rencontrent assez fréquemment en tant que saprophytes des plantes et des animaux ; on les trouve également dans les eaux des rivières et des mers ; seule l'espèce Rhodotorula rubra a été signalée comme pathogène dans quelques cas.

Ces levures ont fait l'objet d'un nombre de travaux biochimiques beaucoup plus restreint que les levures des genres Saccharomyces et Candida.

En ce qui concerne la paroi des levures Rhodotorula, les recherches sont encore plus réduites et les résultats n'apportent des renseignements que sur la composition chimique globale ; ainsi, nous avons une connaissance succincte de la nature des constituants glucidiques et aminés de quelques espèces. En effet, les travaux de CROOK et coll. ont montré dans les polysaccharides constitutifs des parois d'une souche de Rh. aurantiaca, la présence de glucose, galactose, mannose et fucose.

Les études de GORIN et coll. ont conduit à déterminer la structure de certains polysaccharides élaborés et excrétés dans les milieux de culture par plusieurs souches de Rhodotorula. Pour ces auteurs, ces polysaccharides retrouvés dans les milieux ambiants ne seraient que des éléments non polymérisés ou des séquences de polyosides clivés des parois.

Notre travail avait pour but d'apporter une contribution à la connaissance de la structure des parois des levures du genre Rhodotorula et tout particulièrement de Rh. rubra, Rh. glutinis et Rh. aurantiaca.

Ces levures sont des organismes aérobies stricts et ne se trouvent que sous forme levure, ce qui permet d'écarter les influences dues à l'aérobiose et l'anaérobiose ou au dimorphisme relié à la structure pariétale de ces éléments cellulaires.

Il est un fait acquis de nos jours, par tous les auteurs, que la nature du milieu ambiant interfère sur la structure des parois de levures ; aussi afin de déterminer l'influence des teneurs en éléments nutritifs et tout particulièrement des sources azotées et carbonées sur la composition et l'organisation pariétale, nous avons tenu à réaliser la culture des microorganismes dans deux milieux semi-synthétiques distincts. L'un, milieu D, est riche en glucose et a une faible teneur en phosphate, l'autre, milieu V est plus pauvre en source carbonée et se caractérise par une teneur notable en phosphore et en azote.

Suivant les conditions de culture, la morphologie pariétale se modifie ; tout particulièrement, des variations d'épaisseur apparaissent dans les parois. Ces modifications doivent refléter des changements structuraux et biochimiques importants. Ainsi, pour la souche 3044, l'épaisseur des parois est doublée par culture sur milieu V par rapport au milieu D. Nous avons pu remarquer qu'en général les parois de cellules issues du milieu D laissent voir deux zones bien distinctes, l'une fibrillaire, dense aux électrons, pouvant correspondre à la charpente, l'autre peu dense aux électrons et correspondant à la gaine. Les parois de cellules issues du milieu V ne présentent pas de gaine et ont un aspect moins ordonné, elles montrent également des zones peu denses aux électrons.

L'examen de la composition chimique globale des parois fait apparaître que la teneur en azote total des parois ne change guère suivant le milieu de culture bien qu'il y ait des variations partiellement compensées entre glucosamine et protéines. Ce résultat semble indiquer une sorte de compensation entre les deux types de polymères azotés, l'un à base d'hexosamines, l'autre constitué de protéines.

L'analyse de la composition glucidique révèle que dans les parois des levures *Rhodotorula*, la nature des éléments glucidiques est plus variée par rapport à d'autres levures étudiées. Cette variété plus grande d'oses neutres laisse envisager vraisemblablement des structures polysaccharidiques non seulement différentes mais aussi plus complexes que celles décrites jusqu'à présent dans les parois. La culture des levures dans les deux milieux, conduit à des parois dont les rapports molaires des oses neutres ne sont que peu transformés, ce qui tend à montrer que l'essentiel des polymères glucidiques n'est que peu perturbé.

Afin de séparer les éléments polymériques solubles, dont la masse moléculaire permette à la fois une étude des enchaînements et des compositions par groupe d'unités, nous avons traité les parois par l'éthylène diamine. Ce traitement conduit à trois fractions A, B et C bien différenciées par leur solubilité.

La fraction A relativement riche en protéines est soluble dans l'eau et dans l'éthylène diamine, la fraction B est insoluble dans l'eau mais soluble dans l'éthylène diamine, enfin, la fraction C est insoluble dans l'éthylène diamine.

Dans cette dernière fraction, nous obtenons un produit de nature particulière, dont la morphologie présente encore l'aspect fibrillaire que l'on observe dans les parois, ce qui laisse penser que ce produit en constitue l'armature

fondamentale. Cette fraction C est pauvre en protéines mais elle est par contre riche en glucosamine, et c'est de celle-ci que nous avons pu isoler la chitine.

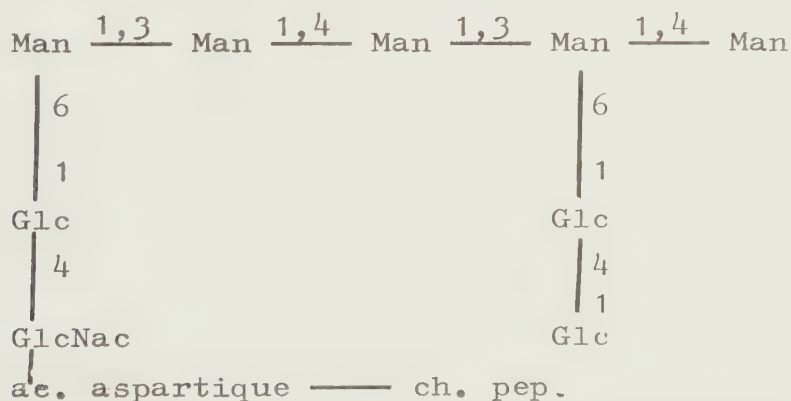
La teneur en chitine dans les parois des *Rhodotorula* étudiées varie suivant les souches et en fonction du milieu nutritif. Les teneurs extrêmes trouvées sont de 0,5 à 12 %. Il convient toutefois de signaler que les variations de concentrations en glucosamine pariétale ne reflètent pas les modifications des teneurs en chitine. Une proportion non négligeable de cette hexosamine susceptible d'être solubilisée par les traitements alcalins et acides doit jouer un rôle structural distinct de la chitine.

Une étude tentée à l'aide de systèmes enzymatiques ne nous a pas permis de lyser les parois, toutefois, les renseignements recueillis indiquent que, suivant le milieu de culture, les parois sont plus ou moins résistantes à l'hydrolyse et ce sont les parois provenant des cellules cultivées dans le milieu V qui sont les plus sensibles aux hydrolyses. Cette observations vient étayer des résultats obtenus par voie chimique et complètent les observations de microscopie électronique qui révèlent un aspect plus disloqué des parois les plus facilement attaquables.

Dans une seconde partie de notre travail, nous nous sommes spécialement attachés à l'étude d'une glycoprotéine isolée des parois de Rh. rubra après culture dans le milieu V.

Nous avons réalisé une série d'études détaillées pour déterminer la structure de cette glycoprotéine que nous avons isolée de la fraction A, soluble dans l'eau, extraite après traitement des parois par l'éthylène diamine. En appliquant les techniques classiques d'étude des glycoprotéines : méthylation des oses, acétolyse, oxydation périodique, nous avons pu rassembler une série de données concordantes. Ainsi la glycoprotéine dont l'homogénéité a été contrôlée par électrophorèse et par ultracentrifugation se caractérise par une masse moléculaire de 64.000. La majorité des éléments constitutifs sont des oses neutres : mannose et glucose.

Les informations que nous avons obtenues sur la structure de cette glycoprotéine ne nous permettent pas de donner la formule définitive, mais nous pouvons cependant les coordonner et ainsi proposer un type de structure indiqué dans le schéma suivant :



Dans cette structure nous remarquons que la copule glucidique est liée à la copule peptidique par un reste glucosamine mettant ainsi en jeu une liaison du type β -N-aspartyl glucosamine. Nous constatons en outre que la substitution de glucose en 1 — 4 dans cette glycoprotéine.

plaide en faveur de données structurales nouvelles dans les parois de levure.

L'ensemble de nos résultats, les premiers réalisés à cette échelle sur ces levures, s'il ne conduit pas à la connaissance parfaite de la structure de levures du genre Rhodotorula, apporte cependant des éléments de base nouveaux qui doivent engendrer d'autres recherches plus spécifiques et plus détaillées sur les données recueillies.

B I B L I O G R A P H I E

- 1 - LEDERBERG J.
Mechanism of action of Penicilline
(1957) J. Bacteriol., 73, 144 - 149
- 2 - STROMINGER J.L., PARK J. T. et THOMPSON R.E.
Composition of the cell wall of staphylococcus aureus ; its
relation to the mechanism of action of Penicilline
(1959) J. Biol. Chem., 234, 3263 - 3268
- 3 - LAMPEN J.O.
External enzyme of yeast ; their nature and formation
(1968) Antonie van Leeuwenhoek, 34, 1 - 48
- 4 - CHATTAWAY F.W., HOLMES M.R. et BARLOW A.S.E.
Cell wall composition of the mycelial and Blastospores
forms of Candida albicans
(1968) J. Gen. Microbiol., 51, 367 - 374
- 5 - BARTNICKI - GARCIA
Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi
(1968) A. rev. Microbiol., 22, 87 - 108
- 6 - TAYLOR I.E.P. et CAMERON D.S.
Preparation and quantitative analysis of fungal cell walls
(1973) Ann. rev. Microbiol., 27, 243 - 259
- 7 - BONALY R. et REISINGER O.
Etude des modifications chimiques et ultrastructures de la
paroi de trois levures du genre Rhodotorula cultivées sur
deux milieux différents
(1971) C.R. acad. Scien., 272, 2309 - 2312
- 8 - ARONSON J.M.
Dans the Fungi pp. 49 -76 (Ainsworth G.C., Sussman A.S.)
Editeur Acad. press. NEW-YORK 748 pages (1965)
- 9 - DARLING S., THEILADE J., BIRCH ANDERSON A.
Structure and chemical composition of prospheoplast
envelopes of Saccharomyces cerevisiae and Hansenula anowala
(1972) J. Bactériol, 110, 336 - 345

- 10 - KILLICK K.A.
Modification of the composition and structure of the yeast cell wall by culture in the presence of sulfur amino acids (1971) J. Bactériol, 106, 931 - 937
- 11 - NOVAES - LEDIEU M., GARCIA - MENDOZA C.
Biochemical Studies on walls synthesized by *Candida utilis* protoplasts (1970) J. Gen. Microbiol, 61, 335 - 342
- 12 - REUVERS T., TACOROUTE E., MENDOZA C.G., NOVAES-LEDIEU M.
Chemical composition of cell walls of *Saccharomyces fragilis* (1969) Can. J. Microbiol, 15, 989 - 993
- 13 - ESQUERRE - TUGAYE M.T., TOUZE A.
La paroi des conidies de *Colletotrichum lagenarium* (Pass.) ELL. et Halst. (1971) phytochemistry, 10, 821 - 827
- 14 - SHAK V.K., KNIGHT S.G.
Chemical composition of Hyphal walls of Dermatophytes (1968) Arch. Biochem. Biophy, 127, 229 - 234
- 15 - SIETSMA J.H., EVELEIGH D.E., HASKINS R.H.
Cell wall composition and protoplast formation of some Oomycete species (1969) Bioch. Biophy. Acta, 184, 306 - 317
- 16 - AITKEN W.B., NIEDERPRUEM D.J.
Ultrastructure changes and biochemical events in basidiospore germination of *Schizophyllum commune* (1970) J. Bactériol, 104, 981 - 988
- 17 - MATILE Ph., MOOR H., et ROBINOW C.F.
Dans The yeast, volume 1 pp 217 - 302, (A.H. ROSE et J.S. HARRISON) editeur Academic press NEW-YORK (1969)
- 18 - PHAFF H.J.
Dans The yeast volume 2 pp 134 - 210, ROSE A.H. et HARRISON J.S., editeur academic press. NEW-YORK (1970)
- 19 - BARTNICKI GARCIA S., NICKERSON W.J.
Isolation, composition and structure of cell walls of filamentous and yeast-like forms of *Mucor rouxii* (1962) Bioch. Biophy. Acta , 58, 102 - 119
- 20 - BARTNICKI GARCIA S.
Chemistry of hyphal walls of *phytophthora* (1966) J. gen. Microbiol, 42, 57 - 69
- 21 - ZEICHMEISTER L. et TOTH G.
The polyoses of the yeast membrane (1934) Biochem. Z., 270, 309 - 316
- 22 - PEAT S., WHELAN W.J. et EDWARDS T.E.
Polysaccharides of Baker's yeast - Part II. yeast glucan (1958) J. Chem. Soc., 3862 - 3869

- 23 - PEAT S. TURVEY J.T., et EVANS J.M.
Polysaccharides of Baker's yeast. Part III. The presence
of 1 - 6 linkages in yeast glucan
(1958) J. Chem. Soc., 3868 - 3870
- 24 - MISAKI A., JOHNSON J., KIRKWOODS S., SCALETTI J.V. et
SMITH F.
Structure of the cell wall glucan of the yeast
(1968) Carb. Res., 6, 150 - 164
- 25 - BACON J.S.D., FARMER V.C., JONES D., et TAYLOR I.F.
The glucan components of the cell wall of Baker's yeast
Sacch. cerevisiae considered in relation to its ultrastruc-
ture
(1969) Biochem J., 114, 557 - 567
- 26 - MANNERS D.V. et MASSON A.J.
The structure of two glucans from yeast cell walls
(1969) F.E.B.S. Letters, 4, 122 - 124
- 27 - BACON J.S.D., JONES D., FARMER V.C., et, WEBLEY D.M.
The occurrence of (1-3) glucan in Cryptococcus, schizosaccha-
romyces and Polyporus species, and its hydrolysis by a
streptomyces culture filtrate lysing cell walls of Cryptococcus
(1968) Biochim. Biophys. Acta, 158, 313 - 315
- 28 - SALKOWSKI E.
Über die Kohlehydrate der Hefe
(1894) Ber. dt. Chem. Ges., 27 497 - 502 et 925 - 926
- 29 - HAWORTH W.N., HIRST E.L. et ISHERWOOD F.A.
Polyssaccharides. Part XXIV. yeast mannan
(1937) J. Chem. Soc., 784 - 791
- 30 - HAWORTH W.N., HEATH R.L. et PEAT S.
The constitution of yeast mannan
(1941) J. Chem. Soc. 833 - 842
- 31 - PEAT S. TURVEY J.R. et DOYLE D.
The polysaccharide of Baker's yeast V.A. further study of
the mannan
(1961) J. Chem. Soc. 3918 - 3923
- 32 - STRYCKOVA T., SANDULA J. et ROSIK J.
XII - Chemical composition of polysaccharides isolated from
cell walls of three strains of Candida guilliermondii (cast)
Langeron et Guerra and their immunochemical properties
(1971) Folia Microbiol, 16, 417 - 425
- 33 - GORIN P.A.J., SPENCER J.F.T. et BHATTACHARJEE S.S.
Structures of yeast mannans containing both and linked
D - mannopyranose units
(1969) Can. J. Chem., 47, 1499 - 1505
- 34 - NORTHCOTE W.J.
The structure and organization of the polysaccharides of yeasts
(1963) Pure appli. Chem., 7, 669 - 675

- 35 - KREGER D.R.
Observation on cell walls of yeast and some other fungi.
by X - Ray diffraction and solubility test
(1954) Biochim. Biophys. Acta, 13, 1 - 9
- 36 - ROELOFSEN A.P. et ILSE HOETTE
Chitin in the cell wall of yeasts
(1951) Antonie van LEEUWENHOCK, 17, 297 - 314
- 37 - SHIFRINE M., PHAFF H.J.
On the cell wall composition of saccharomyces guttulatta
(1958) Antonie van LEEUWENHOCK, 24, 274 - 280
- 38 - FALCONE G. et NICKERSON W.J.
Cell wall mannan protein of Baker's yeast
(1956) Science, 124, 272 - 283
- 39 - KESSLER GIAN et WALTER J. NICKERSON
Gluc-mannan proteine complexes form cell walls of yeast
(1959) J. Biol. Chem., 234, 2281 - 2285
- 40 - KORN F.C. et NORTHCOTE D.M.
Physical and Chemical properties of polysaccharides and
glycoproteines of the yeast cell wall
(1960) Biochem. J., 75, (12 - 17)
- 41 - SENTADREU R. et NORTHCOTE D.M.
The structure of a glycopeptide isolated from the yeast cell
wall
(1968) Biochem. J., 109, 419 - 432
- 42 - SENTADREU R. et NORTHCOTE D.M.
The caractérisation of oligosaccharides attached to thréo-
nine and sérine in a mannan glycopeptide obtained from cell
of yeast
(1969) Carbohy. Res., 10, 584 - 585
- 43 - BIANCHI D.E.
The lipid content of the cell walls obtained from juvenile,
yeast - like and filamentous cells of Candida albicans
(1967) Antonie van LEEUWENHOCK, 33, 324 - 332
- 44 - MILBANK J.W. et MACRAE R.M.
Dégradation of yeast cell wall by fractionated snail gut
enzyme
(1964) Nature London, 201, 1347
- 45 - TANAKA H. et PHAFF H.J.

(1966) Abh. dt. Akad. wiss. Berl. Klasse of Medezine n° 6
pp. 113 - 129
- 46 - EDDY A.A.
The structure of yeast cell walls - degradative studies
with enzymes
(1958) Proc. R. Soc. B, 149, 425 - 440

- 47 - NICKERSON W.J.
Symposium on Biochemical bases of morphogenesis in fungi
(1963) Bact. Rev., 27, 305 - 324
- 48 - CAWLEY T.N. et BALLOU C.E.
Identification of two *Sacchromyces cerevisiae* cell wall
mannan chemotypes
(1972) J. Bactériol, 111, 690 - 695
- 49 - DUELL E.A., INOW D. et UTTER M.F.
Isolation and properties of intact mitochondria from
spheroplasts of yeast
(1964) J. Bactériol, 88, 1762 - 1773
- 50 - CROOK E.M. et JOHNSTON I.R.
The qualitative analysis of the cell walls of selected
species of fungi
(1961) Biochem J., 83, 325 - 332
- 51 - SMITH D.G. et MARCHANT R.
Unbalanced cell wall synthésis in chloramphenicol grown
Rhodotorula glutinis
(1969) Antonie van LEEUWENHOEK, 35, 113 - 119
- 52 - PIERFITTE M., VILLOUTREIX J. et BONALY R.
Présence d'acides gras hydroxylés dans les levures du genre
Rhodotorula
(1967), C.R. Société biologie, 161, 1650 - 1654
- 53 - RUINEN J. et DEINEMA M.H.
Composition and properties of the extracellular lipids
of yeast species from the phyllosphere
(1964) Antonie van LEEUWENHOEK, 30, 377, 384
- 54 - GENTLES J.C. et LATOUCHE C.J. (1969)
Dans the yeast volume 1, p. 166, Rose A.H. et HARRISON J.S.
Academic press. NEW-YORK
- 55 - VILLOUTREIX J.
Thèse sciences NANCY 1960
- 56 - DEINEMA M.H.
Thèse (1961) Agricultural university WAGENINGEN Pays-Bas
- 57 - CONWAY J.E., et BREEN J.
An "ammonia" yeast and some of its properties
(1945) Biochem. J., 39, 368 - 371
- 58 - HOUWINK A.L. et KREGER D.R.
Observations on the cell wall of yeasts, an electron micro-
scope and X - ray diffraction study
(1953) Antonie van LEEUWENHOEK, 3, 1 - 24

- 59 - IERMYN M.A. et ISERWOOD F.A.
Improved separation of sugars on the paper partition
chromatogram
(1949) Biochem J., 44, 402 - 407
- 60 - PARTRIDGE S.M.
Filter - paper partition chromatography of sugars
(1948) Biochem J., 42, 238 - 248
- 61 - TREVELYAN W.E., PROCTER D.P. et HARRISSON J.S.
Detection of sugars on paper chromatograms
(1950) nature, 166, 444 - 445
- 62 - WHITE A.A. et HESS W.C.
Paper chromatographic detection of sugars in normal and
Dystrophic human urines
(1956) Arch. Biochim. Biophys, 64, 57 - 66
- 63 - WILSON C.M.
Quantitative determination of sugars on paper chromatograms
(1959) Anal. Chem., 31, 1199 - 1121
- 64 - DATE J.W.
A quantitative method for estimation of some carbohy-
drate on filter paper
(1958) Scand. J. Clin. Lab. Innest., 10, 149 - 154
- 65 - ZANETTA J.P., BRECKENRIDGE W.E., et, VINCENDON G.
Analysis of monosaccharides By Gas -liquid chromatography
of the O-méthyl glycosides as trifluorocetate derivatives
application to glycoproteines and glycolipids
(1972) J. Chromatogr., 69, 291 - 304
- 66 - MONTREUIL J. et SPICK G.
(1968) Microdosage des glucides, monographie n° 2, LILLE
Faculté de Sciences
- 67 - DUBOIS M. GILLES K.A., HAMILTON K.J., REBERS P.A., et SMITH
F.
Colorimetric method for determination of sugars and related
substances
(1956) Anal. Chem., 28, 350 - 356
- 68 - PARK J.T. et JOHNSON M.J.
A submicrodetermination of glucose
(1949) J. Biol. Chem., 181, 149 - 151
- 69 - FOSTER A.B. et STACEY M.
Ionophoresis of some carbohydrate derivation
(1953) J. app. Chem., 3, 19 -21
- 70 - GHYSEN J.H. TIPPER D.J. et STROMINGER J.L.
dans : Methods in enzymology (COLOWICK S.P. et KAPLAN N.O.
eds)
volume 8 pp. 685 - 699 (1966)

- 71 - HAKAMORI S.
A rapid permethylation of glycolipid and polysaccharide catalyzed by methylsulfinyl carbonion in dimethyl sulfoside (1964) J. Biochem. (TOKYO), 55, 205 - 208
- 72 - FOURNET B. et MONTREUIL J.
Procédé d'identification et de préparation en phase gazeuse des éthers di, tri et tétraméthyle de 1' α méthyl-D-mannoside (1973) J. Chromatog., 75, 29 - 37
- 73 - MICHL H.
Über Papierionophorese bei Spannungsgefällen von 50 Volt/cm (1951) Monatsh Chem., 82, 489 - 493
- 74 - DENT C.E.
Aminoaciduria in Fanconi syndrome study making extensive use of techniques based on paper partition chromatography (1947) Biochem. J., 41, 240 - 253
- 75 - SWEETLEY C.G., BENTLEY R., MAKTA M. et WELLS W.
Gas-liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugars and related substances (1963) J. Amer. Soc., 85, 2497 - 2507
- 76 - GLICK M.C., CHEN I.W. et ZILLIKEN F.
Formation in vitro of 3 - O - β D galactopyranosyl - N-acetyl D glucosamine, free and phosphorylated (1962) J. Biol. Chem., 237, 981-
- 77 - DIXON S. J. et LIPKIN D.
Spectrophotometric determination of ribofuranosides (1964) anal. Chem. 26 n° 6, 1092 - 1093
- 78 - GHUYSEN J.M., TIPPER D.J., BIRGE C.H. et STOMINGER J.L.
Structure of the cell wall of staphylococcus aureus strain Copenhagen. VI the soluble glycopeptide and its sequential degradation by peptidases (1965) Biochem., 4, 2245 - 2254
- 79 - PIEZ K.A. et MORRIS L.
A modified procedure for the automatic analysis of aminoacids (1960) anal. Biochem., 1, 187 - 192
- 80 - MICHALEC C. et KOLMAN Z.
Some new paper chromatographic systems for the characterization of sphingolipids (1966) J. Chromatogr., 22, 385 - 390
- 81 - ANDERSON F.B. et MILLBANK J.W.
Protoplast formation and yeast cell-wall structure. The action of the enzymes of the snail, Helix pomatia (1966) Biochem. J., 99, 682 - 687

- 82 - STOCKES J.L.
Influence of temperature on the growth and metabolism of yeasts "dans the yeast, tome 2 édité par Rose A.H. et Harrison J.S."
pp. 119-134 - Academic press NEW-YORK 1970
- 83 - NORTHCOTE D.H. et HORNE R.W.
The Chemical composition and structure of the yeast cell-wall
(1951) Biochem. J., 51, 232 - 239
- 84 - ROELOFSEN P.A.
Yeast mannan, a cell wall constituent of Baker's yeast
(1953) Biochem. Biophys. Acta., 10, 477 - 483
- 85 - BELL D.J. et NORTHCOTE D.H.
The structure of a cell-wall polysaccharide of Baker's yeast
(1950) J. Chem. Soc. 1944 - 1947
- 86 - BISHOP C.I., BLANK F. et GARDNER P.E.
The cell wall polysaccharides of Candida albicans, glucan, mannan and chitin
(1950) Can. J. Chem., 38, 869 -
- 87 - YU R.J., BISHOP C.T., COOPER F.P., BLANK F. et MASENCLEVER H.F.
Glucans from Candida albicans (serotype B) and from C. parapsilosis
(1967) Can. J. Chem., 45, 2364 - 2267
- 88 - PEAT S. WHELAN W.J. et EDWARDS T.E.
Polysaccharides of Baker's yeast. Part IV - mannan
(1961) J. Chem. Soc. 29-36
- 89 - MC MURROUGH I. et ROSE A.M.
Effect of growth rate and substance limitation on the composition and structure of the cell-wall of Sacch. cerevisiae
(1967) Biochem. J., 105, 189 - 203
- 90 - DYKE K.G.
The Chemical composition of the cell wall of the yeast Nadsonia elongata
(1964) Biochim. Biophys. Acta, 82, 374 -
- 91 - DUMAZERT C. et MARCELET Y.
Sur un nouveau catalyseur de minéralisation en vue du dosage de l'azote par la méthode de KJELDAHL. Dosage de l'azote dans les protéines, les poudres d'organes, les fèces
(1937) Bull. Soc. Chimie Biol., 20, 201 - 211

- 92 - POWER D.M. et CHALLINOR S.W.
The effects of inositol - deficiency on the Chemical composition of the yeast cell wall
(1969) J. Gen. Microbiol, 55, 169 - 176
- 93 - KANETSUNA F., CARBONELL L.M., MORENS E.R. et JOAQUIN R.
Cell wall composition of the yeast and mycelial forms of PARACOCIDIoidES brasiliensis
(1969) J. of Bactériol, 97, n° 3 1036 - 1041
- 94 - JONES J.K.N.
The structure of the mannan present in Porphyra umbilicolis
(1950) J. Chem. Soc. 3292 - 3295
- 95 - MONTREUIL J. et SCHEPPLER N.
Chromatographie quantitative des oses constituants des glycoprotéïdes
(1959) Bull. Soc. Chim. Biol., 41, 13 - 28
- 96 - MONSIGNY M.
Description d'un dispositif de dosage automatique des osamines adapté à la chromatographie sur colonnes de résines échangeuses de cations
(1969) Bull. Soc. Chim. Biol., 51, 1263 - 1269
- 97 - DOMER J.E.
Monosaccharide and chitin content of cell walls of HISTOPLASMA capsulatum and Blastomyces dermatitidis
(1971) J. of Bactériol., 107, pp 870 - 877
- 98 - JEUNIAUX C.
Dans chitine et chitinolyse pp 46 - 62
(1963), Masson et Cie eds, PARIS
- 99 - SCHMIDT M.
Makrochemische untersuchungen über das vorkommen von chitin bei Mikroorganism
(1963) Arch. Mikrobiol, 7, 241 - 260
- 100 - BACON J.S.D., DAVIDSON E.D., JONES D. et TAYLOR I.F.
The location of chitin in the yeast cell wall
(1966) Biochem J., 101, 366 - 382
- 101 - CABIB E. et BOWERS B.
Chitin and yeast budding. Localization of chitin in yeast bud scars
(1970) The Journ.of Biological Chemis., 246, 152 - 173
- 102 - BACON J.S.D., MILNE B.D., TAYLOR I.F., WEBLEY D.M.
Features of the cell-wall structure of yeast revealed by the action of enzymes from a nonfruiting myxobactérium
(1965) Biochem. J., 95, 28 C - 30 C

- 103 - BERAN K. et REHACEK J.
Content and structure of chitin in cell walls of the
yeast *saccharomyces cerevisiae*
(1969) *Antonie van LEEUWENHOK*, 35, B₃ - B₄
- 104 - HORTON D. et WOLFROM M.L.
Polysaccharides in comprehensive Biochemistry
(1962) *Florkin et Stotz* edit.
- 105 - CLARK G. L. et SMITH A.F.
X ray diffraction studies of chitine, chitosan and derivatives
(1936) *Journal of physical chemistry*, 40, 863 - 879
- 106 - LOTMAR W. et RICKEN E.R.
A New crystallographic modification of chitin and its
distribution
(1950) *Experientia*, 6, 58
- 107 - DWELTZ N.F.
The structure of chitine
(1961) *Biochim. Biophy. Acta*, 51, 283 - 294
- 108 - HOUWINK A.L., KREGER D.R. et ROESLOFSEN P.A.
Composition and structure of yeast cell walls
(1951) *nature*, 168, 693 - 694
- 109 - BONALY R., MOULKI H., BENJELLOUN A.T. et PIERFITTE M.
Etude des parois de levures du genre *Rhodotorula*.
II influence des conditions de culture sur la composition
chimique des parois
(1971) *Biochim. Biophy. Acta*, 244, 484 - 494
- 110 - CARLSTROM D.
The polysaccharide chain of chitin
(1962) *Biochem. Biophy. Acta*, 59, 361 - 364
- 111 - FALK M. SMITH D.G., Mc LACHLAN J., Mc INNES A.G.
II proton magnetic resonance, infrared and X - ray studies
(1966) *Can. J. Chemistry*, 44, 2269 - 2281
- 112 - THOMPSON E. et ROSS CALVIN J.
Composition of the cell wall of *Pityosporum ovale*
(Bizzozero) Castellani and Chalmers
(1970) *Can. J. Microbiol*, 16, 263 - 265
- 113 - Mc LELLAN, W.L. et LAMPEN J.O.
Phosphomannanase (PR. - factor), an enzyme required for the
formation of yeast protoplasts
(1968) *J. Bacteriol.*, 95, 967 - 974
- 114 - TANAKA H., PHAFF H.J.
Enzymatic hydrolysis of yeast cell walls
I - isolation of wall - decomposing oraganisms and separa-
tion and purification of lytic enzymes
(1965) *J. Bacteriol.*, 89, 1570 - 1580

- 115 - GORIN P.A., SPENCER J.F.I. et EVELEIGH D.E.
Enzymic degradation of yeast cell wall mannans and galactomannans to polymeric fragments containing α 1 — 6 linked D mannopyranose residues
(1969) Carbohy reserch., 11, 387 - 389
- 116 - NAGASAKI S. NEUMANN N.P. ARNOW P. et LAMPEN J.O.
An enzyme which degrades the walls of living yeast
(1966) Biochem. Biophys. res. commun., 25, 158 - 164
- 117 - HOLDEN M. et TRACEY M.V.
Enzymes that break tobacco-leaf components II
Digestive juice of Helix on defined substances
(1950) Biochem. J., 47, 407 - 414
- 118 - KILLICK K.A.
Modification of pigmentation and cell-wall structure of Rhodotorula aurantiaca by culture in the presence of sulfur aminoacids
(1972) Canad. J. Microbiol, 18, 423 - 427
- 119 - JONES D., BACON J.S.D., FARMER V.C. et WEBLEY D.M.
A study of the microbiol lysis the cell walls of soil yeasts (Cryptococcus PP)
(1969) soil Biol. Biochem. ,__, 145 - 151
- 120 - MONSIGNY M.
Thèse Doct. sci., LILLE, 1968,
- 121 - MANNERS D.J. et PATTERSON J.C.
Reexamination of the molecular struct. of yeast glucan
(1966) Biochem. J., 98, 19C - 20C
- 122 - GORIN P.A.J. et PERLIN, A.S.
A mannan produced by Saccharomyces rouxii
(1956) Can. J. Cem., 34, 1796 - 1803
- 123 - JONES, J.K.N. et NICKOLSON W.H.
The acid catalysed reversion of L. arabinose and of D. mannose
(1958) J. Chem. soc. 27-33
- 124 - STEWART T.S. et BALLOU C.E.
A comparaison of yeast mannans and phosphomannans by acétolysis
(1968) Biochemistry N.Y., 7, 1855 - 1863
- 125 - STEWART T.S., MENDERSHAUSEN, P.B. et BALLOU C.E.
Preparation of a mannopentaose, mannohexaose, and mannoheptaose form Saccharomyces cerevisiae mannan
(1968) Biochemistry N.Y. 7, 1843 - 1854
- 126 - GORIN P.A.J. et SPENCER J.F.T.
Structural chemistry of fungal polysaccharides
(1968) Advan. Carbohyd. Chem., 23, 367 - 417

- 127 - GORIN P.A.J. et SPENCER J.F.T.
An exocellular mannan, alternately linked 1 3 and
1 4 from Rhodotorula glutinis
(1965) Canadian J. of Chemistry, 43, 950 - 954
- 128 - PAGET M. et COUSTENOBLE P.
Microélectrophorèse des glycoprotéines seriques sur
acétate de cellulose gélatineux et sur polyacétate
de cellulose
(1966) Ann. Biol. clin., 24, 181
- 129 - FOURNET D.
Thèse Doct. Sciences - Faculté des Sciences et Techniques
LILLE
(1973)
- 130 - PETEK F. et DONG T.
Chromatographie ascendante sur papier des hexoses méthylés
(1962) Bull. Soc. Chim. Biol., 44, 1134 - 1140
- 131 - MONTREUIL J.
Procédé de détermination de la composition et de la struc-
ture de la fraction glucidique 175 - 269
dans problèmes actuels de Biochimie générale, (BOULANGER
et POLONOWSKI) - (Masson et Cie) PARIS pp. 331
- 132 - BAYARD B.
Thèse Doctorat 3ème cycle, Faculté des Sciences LILLE
(1970)
- 133 - MOULKI H. et BONALY R.
Résultats non publiés
- 134 - MONSIGNY M., ADAM-CHOSSON A., et MONTREUIL J.
Etude sur les glycoprotéides
XXII détermination de la nature du point d'attache
glycane-protéine
dans les préparation d'ovomucoïde de Poule
(1968) Bull. Soc. Chim. Biol. 50 857 - 874

NANCY, le 10 juin 1974

Le Président de Thèse, Monsieur BENE

Ruf

VU et APPROUVE,

NANCY, le 10 juin 1974

Le Doyen de la Faculté des Sciences
Pharmaceutiques et Biologiques de NANCY I,



VU, NANCY le 11 Juin 1974

Le Président de l'Université de NANCY I,

